

# キネシン分子モーターの

## 1 分子顕微機能解析

Microscopic analysis of kinesin molecular motors

平成 15 年 3 月

川口憲治

# 【目次】

目次	.....1
<b>第 1 章 序論</b>	
Introduction	..... 5
1-1) はじめに	..... 5
1-2) 研究の背景	..... 7
1-2-1) キネシンの歩行メカニズム	..... 7
1-2-1-1) Hand-over-hand モデル	..... 8
1-2-1-2) キネシンのプロセッシブ性とメカノケミカルサイクル	..... 9
1-2-1-3) 破断力測定による結合様式の決定	..... 9
1-2-1-4) ネックリンカーの構造変化の検出	..... 10
1-2-1-5) Biased Brownian ラチェットモデル	..... 11
1-2-2) キネシンの運動方向性の決定	..... 12
1-3) 本論文の概要	..... 13
第 1 章の図	..... 17
<b>第 2 章 実験系の概要</b>	
Materials and methods	
2-1) 細胞骨格タンパク質の調製	..... 21
2-1-1) チューブリンとキネシン	..... 21
2-1-2) チューブリンの調製	..... 21
2-1-3) 蛍光チューブリンの調製	..... 26
2-1-4) チューブリンの重合	..... 28
2-1-5) キネシンの精製	..... 29
2-2) 顕微解析系について	..... 35
2-2-1) キネシンビーズアッセイ	..... 36
第 2 章の図	..... 38

### 第 3 章 キネシン 1 分子の発生力、速度、プロセッシブ性の温度依存性

#### Temperature dependence of force, velocity, and processivity of single kinesin molecules

3-1) 序文	..... 39
3-2) 研究の背景	..... 39
3-3) 材料と方法	..... 40
3-3-1) タンパク質	..... 41
3-3-2) ビーズアッセイ	..... 41
3-3-3) ビーズアッセイ用フローセルの作り方	..... 41
3-3-4) 顕微鏡	..... 42
3-3-5) 温度コントロール	..... 42
3-3-6) 1 分子キネシンつきビーズの滑り速度の測定	..... 42
3-3-7) キネシン 1 分子による力発生	..... 43
3-3-8) 力? 速度曲線の測定	..... 43
3-4) 実験結果と考察	..... 43
3-4-1) 滑り速度の温度効果	..... 44
3-4-2) プロセッシブ性に対する温度効果	..... 44
3-4-3) 発生力の温度依存性	..... 45
3-4-4) 力? 速度関係の温度依存性	..... 46
第 3 章の図	..... 48

### 第 4 章 温度パルス顕微鏡法によるキネシン 1 分子の熱励起

#### Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy

4-1) 序文	..... 52
4-2) 研究の背景	..... 52
4-3) 材料と方法	..... 53

4-3-1) タンパク質	..... 53
4-3-2) 微小管滑り運動系と TPM のためのフローチャンバー	..... 54
4-3-3) 温度パルス顕微鏡法(TPM)	..... 54
4-4) 実験結果	..... 55
4-4-1) 微小管滑り速度への温度パルス効果	..... 55
4-5) 考察	..... 57
4-5-1) TPM 法を用いてのキネシン分子の熱励起	..... 57
4-5-2) プロセッシブ性に対する温度効果	..... 59
4-6) 結論	..... 59
第 4 章の図	..... 61

## 第 5 章 キネシンのヌクレオチド結合に依存する単頭 双頭結合

### Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin

5-1) 序文	..... 66
5-2) 研究の背景	..... 66
5-3) 材料と方法	..... 67
5-4) 実験結果と考察	..... 68
第 5 章の図	..... 71

## 第 6 章 1 分子力学によるキネシンの単頭・双頭結合間の 平衡と転移

### Equilibrium and transition between single- and double-headed binding of kinesin as revealed by single-molecule mechanics

6-1) 序文	..... 75
6-2) 研究の背景	..... 75
6-3) 材料と方法	..... 77
6-3-1) タンパク質	..... 77

6-3-2) ビーズアッセイ	..... 77
6-3-3) 装置系	..... 79
6-3-4) モデル解析	..... 79
6-4) 実験結果	..... 79
6-4-1) キネシン・微小管複合体の破断力測定	..... 79
6-4-2) ヌクレオチドなし状態における破断力分布	..... 80
6-4-3) AMP-PNP 存在下における破断力分布	..... 81
6-4-4) キネシン・微小管複合体の弾性率	..... 83
6-5) 考察	..... 85
6-5-1) キネシンの単頭、双頭結合	..... 85
6-5-2) ヌクレオチドなし状態、AMP-PNP 存在下における キネシンの結合様式	..... 85
6-5-3) モデル解析	..... 88
6-5-4) 力学的な性質、負荷方向の非対称性とその生理学的意義	..... 92
6-5-5) キネシン・微小管複合体の寿命と破断力の関係	..... 93
6-5-6) キネシン・微小管複合体の伸びについて	..... 93
第 6 章の図	..... 95
 <b>第 7 章 まとめ</b>	
<b>Conclusion</b>	
7-1) 本論文のまとめ	..... 106
7-2) 今後の展望	..... 107
 参考文献	 ..... 109
 研究業績	 ..... 116
 謝辞	 ..... 120

# 【第 1 章】

## 序論

### Introduction

#### 1-1) はじめに

真核細胞の細胞骨格は、アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメントという3種のタンパク質フィラメントが、付属タンパク質とともに細胞内でそれぞれ二次元あるいは三次元的構造をつくったものである。真核細胞はその生命活動(細胞周期を含む)の過程でさまざまな運動をするが、その基盤はこれらの細胞骨格にある。細胞運動は運動を起こすモータータンパク質とフィラメント構造の種類によって、大きく2つに分けることができる。例をあげると次のようなものがある。

)アクチンフィラメントによって構築された構造の上を、モータータンパク質ミオシンが滑走することによって起こる運動:われわれの身体の活動を支える筋肉収縮、細胞を2つに分割する細胞分裂、細胞が異物を取り込む運動(食作用:phagocytosis)、初期発生の過程でみられる細胞や組織の変形、白血球や原生動物アメーバーなどの移動を伴う運動、そして植物細胞の運動として有名な原形質流動など。

)微小管(構成タンパク質はチューブリン)によって構築された構造の上を、ダイニンやキネシンと呼ばれるモータータンパク質が滑走することによって起こる運動:精子の鞭毛運動、気管や輸卵管などの繊毛運動、細胞分裂のうち染色体を2つに分離する核分裂、細胞内の果粒の運動(例えば神経軸索内の輸送)など。

しかしながら細胞生物学者によって観察されたさまざまな運動現象と、生化学者や生物物理学者によって築かれてきた分子レベルでのモータータンパク質の働きに関する理解は、筋収縮などの一部の例を除いてはあいまいなものであった。分子モーターに関する我々の理解は最近の十数年間で飛躍的に進んだ。この多大な進歩はいくつかの重要な発見と技術的進歩によって導

かれている。

第 1 は 1980 年代後半の、この論文の題材でもあるキネシンの発見である (Vale *et al.*, 1985)。それまで微小管系の唯一の分子モーターであると考えられていたダイニンに加え、第 2 の微小管分子モーターとしてキネシンが発見されたことは分子モーター自体の多様性を示唆し、細胞運動の多様性解明への糸口になった。分子モーターの多様性は、その後 1990 年代に入ってからミオシンスーパーファミリー、キネシンスーパーファミリーおよびダイニンスーパーファミリーの発見によって確実なものとなり、分子モーターの研究が生理学の 1 分野にとどまらず、さまざまな生理学の分野を包含する課題となった。これまで細胞の運動性が関与するとは思われなかったような現象、例えばイオンチャンネルの調節やシグナル分子の調節の問題にも分子モーターの関与が研究されるようになった。

第 2 に、ミオシン及びキネシンモーター部位の三次構造の解析の成功があげられる (Kull *et al.*, 1996)。この詳細な分子構造解析によって分子モーターのメカニズム、つまりいかにして分子モーターが ATP 分解の化学エネルギーを力学エネルギーに変換するかという、古くからの生理学上の重要な問題の解明へ向けて大きな一歩が踏み出された。

第 3 には、近年めざましい発展をとげている分子の動きに対する顕微鏡解析技術と実験手法の進歩である。その最初は、1990 年代前半から導入された、*in vitro* motility assay という蛍光顕微鏡下において、モータータンパク質によって生じる運動(例えば蛍光標識アクチンフィラメントの動き)を測定する方法であり、モータータンパク質の機能を試験管で直接定量的に再現できる画期的技術であった (Harada *et al.*, 1990)。さらに近年の技術的進歩は単一分子の張力測定、さらに単一分子の動きまで解析できるようになってきている。このような最先端の技術を駆使して、分子モーター機能に共通のメカニズムや各分子モーターの特徴が解明されていくことであろう。

最後に忘れてはならないのは、これらモータータンパク質の遺伝子が明らかになり、数々の遺伝病に関係していることが明らかになってきているということである (Goldstein, 2001)。ダイニンが関与する遺伝病にみられるように、細胞機能の変化がモーター機能の変異によって容易に推測できるものも

あるが、一方ではモータータンパク質の寄与が考えられていなかった系の異常がモータータンパク質の遺伝子変異に帰結される例が幾つか見い出されてきている。このように、疾患から逆にモータータンパク質の生理的機能の解明の糸口が見つかることも今後増えてくるであろう。

## 1-2) 研究の背景

上述したようにキネシンは、ダイニンに続く微小管系の第 2 のモータータンパク質として約 15 年前にイカの神経軸索で見出された (Vale *et al.*, 1985)。細胞内で小胞や細胞内小器官の輸送を行い、順行性(神経体からシナプス末端へ向かう)の軸索流や、細胞分裂時の中心体の分離と紡錘体の形成にも重要な役割を担っている。ゲノム解析の結果、キネシンは 10 種のサブファミリーに分類され(キネシン様タンパク質、KRP)、ヒトやマウスでは 45 種類が同定されている。最初にイカから精製された天然のキネシン(従来型キネシン, conventional kinesin とよぶ)は一般に神経軸索にあって小胞輸送を担い、340 個のアミノ酸からなる相同な 2 つの球状頭部を持つ(図 1-1)。キネシン分子モーターは、この 2 つの頭部が微小管との結合・解離を交互に繰り返しつつ微小管のプラス端(重合端)側に向かって“歩く”リニアモーターであるといわれている。そこには ATP 加水分解と共役した巧妙な仕組みが存在する。キネシンの特徴は、たった 1 分子でも微小管から解離することなく長距離(1 $\mu$ m 程度)かつ長時間(1 秒程度)にわたって運動を持続するというプロセッシブ性(逐次前進性)にある。このことと、分子量が小さく安定なことから、キネシンはミオシンやダイニンに比べて研究しやすく、最近の研究の進展には目覚ましいものがある。原子間力顕微鏡(AFM)や光ピンセットによる 1 分子操作・計測、電子顕微鏡構造解析や光学顕微鏡による 1 分子イメージングなどの生物物理学的手法、それに加えて、特定のアミノ酸を置換した変異体を調製できる遺伝子工学的手法を用いた多くの研究成果が報告されている。この章では、これまでに明らかになった実験事実とキネシンの歩く仕組みを中心に解説する。



## 1-2-1) キネシンの歩行メカニズム

### 1-2-1-1) Hand-over-hand モデル

研究初期の重要な生化学上の発見は、キネシンに結合した ADP の解離を微小管の結合が促進するというものであった。精製したキネシンはその両方の頭部に ADP を結合している。ADP の結合はキネシンの構造を安定化し、解離速度は非常に遅い(キネシンはヌクレオチドがないと変性しやすいが、微小管に結合すると安定化する)。ところがそこに微小管を加えると、結合していた ADP の半分が解離した。さらに ATP を加えると、もう半分の ADP が解離した。この結果の解釈は、一方の頭部が微小管に結合すると ADP を解離し、その頭部に ATP が結合することによってもう一方の ADP 結合頭部が微小管に結合できるようになり、ADP の解離が起こるというものである。このことから、微小管に結合した頭部に ATP が結合すると、キネシンは次の一步を踏み出すための構造変化を引き起こす、という描像が生まれた(Hackney, 1988; Hackney, 1994)。

双頭構造をもつ従来型キネシンはプロセッシブであり、微小管から解離するまでに 8nm ステップを 1 秒間に 100 回以上繰り返す(Svoboda *et al.*, 1993)。8nm は  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットで構成されている一対のチューブリンヘテロダイマーのサイズに対応する。また、従来型キネシンはタイトカップリング型モーターであり、8nm ステップは 1 回の ATP 加水分解を伴う(Hua *et al.*, 1997; Schnitzer and Block, 1997)。では、ATPase サイクルのどの段階でステップを生じるのだろうか？ATP 結合時か、それとも加水分解した後か？あるいは前頭部が結合する瞬間にステップが生じるのだろうか？ATP 結合に伴ってネックリンカーと呼ばれる部分が構造変化を起こすことが分かっているが(1-2-1-4 節で詳述)、これにはエネルギー変化がほとんど伴わないと言われている。従って、少なくとも ATP 結合時ではないと推測される。モーターのステップと ATPase サイクルの各段階との対応づけは確定していない。最近西山ら(Nishiyama *et al.*, 2001)によって 8nm ステップが 2 つの 4nm ステップからなっていることが示されたこともあり、この問題は今後キネシンの歩行メカニズムを解明する上での鍵である。

キネシンのプロセッシブ性を説明するために以前から提案されているのが、hand-over-hand モデルである(Vale and Milligan, 2000; Schief and Howard, 2001; Howard, 2001)。図 1-2 に、現在知られているこのモデルの簡易版を示した。(A)ADP 結合状態で精製されたキネシンの一方の頭部は、微小管に結合すると直ちに ADP を解離してヌクレオチドなし状態で結合する。もう一方の頭部は ADP を結合したまま解離状態にある。(B)微小管と結合している頭部に ATP が結合するとその頭部内のネックリンカードメインが構造変化を起こしてプラス端方向に固定される(結合頭部の 2 重矢印)。(C)その結果、解離頭部は前方に移動し、微小管の結合部位に結合できるようになり、ADP を放出してヌクレオチドなし状態で結合する。つまり、この瞬間に双頭結合になる。(D)後頭部に結合した ATP は加水分解され、リン酸が放出されるとネックリンカードメインはまたもとの状態に戻り、後頭部は微小管から解離する(リン酸が放出される前に解離するのか、放出後に解離するのかは不明)(Schief and Howard, 2001)。このように、キネシンは ATP/ADP の結合部位にある硬いらせん構造をとったリン酸感受性ループと、ATP が結合すると固定されるネックリンカードメインとの間にアロステリック制御が働くとされる。

### 1-2-1-2) キネシンのプロセッシブ性とメカノケミカルサイクル

分子モーターがプロセッシブであるためには高い duty ratio(1 回の ATP 加水分解サイクルに占める結合時間の割合)が必須であるという考え方がある(図 1-3)。双頭構造を持つ分子モーターがプロセッシブであるためには、それぞれの頭部の duty ratio は少なくとも 0.5 以上でなければならない。0.5 以下だと双頭ともに解離してしまう瞬間が生じると考えるのである。一方、筋肉を構成する非プロセッシブなミオシンでは、duty ratio は 0.01 ~ 0.1 であり、従ってアクチンフィラメントに滑り運動を引き起こすためには 10 ~ 100 の頭部が必要だというわけである(注:ミオシンの duty ratio については異論がある)(Howard, 2001)。

### 1-2-1-3) 破断力測定による結合様式の決定

キネシンのヌクレオチド結合部位はヌクレチドなし状態と、ATP、ADP・Pi、ADP 結合の、少なくとも 4 つのヌクレオチド状態をとるはずである。この 4 つのヌクレオチド状態と、強結合・弱結合状態、及び解離状態を区別したキネシンのメカノケミカルサイクルに関するモデルが上記の hand-over-hand モデルであり、これを立証するためにはキネシンの 2 つの頭部がどのヌクレオチド状態で単頭結合なのか、あるいは双頭結合なのか、またこの 2 状態間の転移はいつどのように行われるのかを決定する必要がある。双頭キネシン・微小管複合体のクライオ電子顕微鏡による画像解析は決定的でなく、ヌクレオチドなし状態と AMP-PNP（非分解性の ATP アナログ）存在下の両方で単頭結合が優位に観察されるという報告(Hirose *et al.*, 1999)と双頭結合が優位であるという報告(Hoenger *et al.*, 2000) の両方がある。しかし、これらの結果は、微小管(チューブリン)よりもモル比で過剰なキネシン分子を加えた条件下で得られたものであり、隣接して結合することによってキネシン(あるいはチューブリン)の構造が歪んでいる可能性が指摘されている(Hoenger *et al.*, 2000)。

本研究を通じて、微小管に結合している 1 分子のキネシンの力学特性をそれぞれのヌクレオチド状態で調べ、単頭結合か双頭結合か、あるいは単頭結合であっても強結合か弱結合かの結合様式に関する直接的な証拠を得た(図 1-4)(Kawaguchi and Ishiwata, 2001; Uemura *et al.*, 2002)。

#### 1-2-1-4) ネックリンカーの構造変化の検出

キネシンと微小管の結合状態を捉えたクライオ電子顕微鏡解析もキネシン頭部の動きについて有力なヒントを与えた(Hirose *et al.*, 1999)。ヌクレオチドなし状態で結合頭部のマイナス端側に位置していた解離頭部が、AMP-PNP を加えると結合頭部のプラス端側へと移動しており、結合頭部のネックリンカーと呼ばれる部分が大きく構造変化しているように見えた。この結果は、ネックリンカーの C 末端部を金コロイドでラベルしたキネシンモノマーに AMP-PNP が結合すると、期待通りに金コロイドの位置が頭部内を移動したことで最近確かめられた(Rice *et al.*, 1999)。それによると、微小管に結合した頭部のネックリンカーは、ヌクレオチドなし状態、あるいは

ADP 結合状態では動きやすい状態にあるが、ATP が結合すると微小管のプラス端方向に向かって振れ、結合頭部の表面に固定される。この動きを利用して解離頭部は前方のチューブリン分子の結合部位に近づき、結合できるようになると考える。このように、せいぜい5nm しか離れていない2つの頭部(Kozielski *et al.*, 1997)がどのようにして8nm のステップを踏めるのかという前々からの疑問が、ネックリンカーの構造変化で説明できるようになった。それでは単に双頭構造であればプロセッシブになるかということ、そうではない。キネシン様モータータンパク質の *ncd* は双頭構造を持つにもかかわらず非プロセッシブであり、連続して2回ステップすることさえできないからである(Endow and Higuchi, 2000)。従来型キネシンが高いプロセッシブ性を持つ秘密は、少なくとも一方の頭部が常に微小管に結合しつづけていることにある。すなわち、単に duty ratio が0.5以上であるというだけでなく、結合している頭部はもう一方の頭部が次の結合部位に結合するまでは離れない、という特別な仕組み(双頭間の協調性)が存在することになる。

### 1-2-1-5) Biased Brownian ラチェットモデル

hand-over-hand モデルがキネシン分子自身の構造変化を中心に提案されたモデルであるのに対し、ブラウン運動(熱揺らぎ)や相互作用ポテンシャルの非対称性が中心的な役割を果たしていると主張するのが、Biased Brownian ラチェットモデルである(Vale and Oosawa, 1990; Astumian, 1997; 徳永, 1997)。このモデルでは、キネシンと微小管の分子間相互作用ポテンシャルはノコギリ歯状になっていて、熱揺らぎによってポテンシャルの山を越えるか、ATP の加水分解に伴ってポテンシャルが変形するかによってキネシンが一方向に移動できるようになると考える(図 1-3)。最近、このモデルを支持するような実験データが、単頭キネシン様モータータンパク質の KIF1A で報告されている(Okada and Hirokawa, 1999)。単頭の KIF1A が平均1  $\mu\text{m}$  も解離せずに微小管のプラス端方向に移動するのである。

どのような仕組みで、単頭 KIF1A は微小管から解離することなく一方向に移動できるのだろうか？微小管と結合している KIF1A の触媒部位の構造を、ADP 状態と AMP-PNP 状態とで電子顕微鏡解析し、X 線結晶解析で得

られた構造をあてはめて解析すると、ADP 状態の触媒部位の長軸(頭部は楕円形をしている)はAMP-PNP 状態のそれよりも微小管のプラス端方向に 20 度ほど時計回りに傾いていた。つまり、AMP-PNP 状態の方が、KIF1A の触媒部位が微小管のプラス端方向、つまり歩行する方向に向いているとみることができる(Kikkawa *et al.*, 2001)。その上、KIF1A はキネシンと同様の微小管結合部位とリジンに富むループ(K-ループ)を持っていて、このループがチューブリンのグルタミン酸に富む C 末端部と結合する。つまり KIF1A は単頭内部に 2 つのチューブリン結合部位を持っていて、これを利用して解離することなく運動できることが分かってきた(Kikkawa *et al.*, 2001)。事実、このループを削除したり変異させたりするとプロセッシブ性が減少した。さらに、従来型キネシンの単頭部分(そのままでは非プロセッシブ)の K-ループをリジン 6 個分だけのばすと、KIF1A と同様にプロセッシブにすることができた。

KIF1A の歩行運動は、その速度が大きく変動するという点でキネシンと異なる。さらに興味深いことに、KIF1A の移動ステップは、ATP の加水分解と 1:1 に対応しなかった。無負荷の時でさえ、1 ステップの間に数個の ATP が分解した。これらのことは、KIF1A の移動運動に、微小管に沿った拡散(Brown)運動が大きな役割を演じていることを示唆する。この点が、1 ステップと 1 ATP 分解とが対応する(タイトカップリング)従来型キネシンと大きく異なる。ところで最近喜多村らによって、ミオシンの単頭酵素断片(S1)が一個の ATP 分解に対して 5.5nm のステップを 1~5 回行うこと(ルースカップリング)を示す結果が得られた(喜多村ら, 2000)。したがって、ミオシンの運動は確率的な分子機構によることが示唆されている。つまり、分子モーターは自らの構造変化だけでなくブラウン運動を巧みに利用して方向性運動を生み出しているというのがこのモデルの本質である。

### 1-2-2) キネシンの運動方向性の決定

キネシンは微小管のプラス端方向に歩行運動するが、同じキネシンファミリーでも ncd や Ker3、それに細胞質ダイニンはマイナス端方向に運動する。特にキネシンと ncd ではモーターコア(モータードメインのうちネックリン

カーに相当する部位は含まない)のアミノ酸配列や立体構造がほとんど同じであるにも関わらず運動の方向性が異なる。事実、キネシンのモーターコアを ncd のモーターコアと置換しても運動方向はプラス端方向であり、逆の組み合わせにしても、マイナス端方向への ncd の運動性は変わらなかった。両者が構造の上で大きく異なる点は、二量体を形成する coiled coil 部分とモーターコアをつなぐドメイン(キネシンの場合はネックリンカーを含む)である。そのため、そのドメインの遺伝子改変による運動性の変化が研究され、ncd のモーターコアをキネシンのモーターコアに置換した上で、さらに coiled coil をつなぐ Loop L0 の Gly347 と Asn348 を削除した変異体がプラス端へと運動方向を変えることが示されている(Wade and Kozielski, 2000)。また、Endow と樋口により、ncd の同じドメインにある 340 番目の Asp を Lys に変えた変異体は、プラス端とマイナス端のどちらにも従来型 ncd と同じ速さで運動することが見出された(Endow and Higuchi, 2000)。ちなみに、キネシンのモーターコアは N 末端側にあり ncd では C 末端側にあるが、この違いは方向性に関与していないとされている。このように、運動方向性の研究も、この 1, 2 年で急速に進んでいる。ミオシンファミリーでも、従来型のミオシン やミオシン がアクチンの B 端(重合端)側へそれぞれ滑り運動と歩行運動するのに対し、最近発見されたミオシン は逆方向の P 端側へと歩行運動する。運動方向性のメカニズムについても、立体構造による空間配置や負荷の影響など、今後多角的な研究が期待される。

### 1-3) 本論文の概要

本論文は、キネシンと微小管の相互作用を多分子レベルと 1 分子レベルで顕微解析し、得られた研究の成果をまとめたものである。

第 1 章では、キネシンが発見された背景、その研究の意義、本論文の概要などについて述べる。

第 2 章では、本研究で使用した実験系、タンパク質の精製法などについて述べる。具体的には、微小管の構成要素であるチューブリンの精製法、その重合や蛍光標識の仕方、キネシンの精製法について述べる。キネシンを題材

にした研究は当研究室においては初めてのため、詳しい精製方法を示した。

第 3 章では、キネシン 1 分子の発生力、歩行速度、プロセッシブ性の温度依存性について述べる。実験では牛の脳神経細胞から精製したキネシン分子を直径  $1\text{ }\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズ 1 個あたり 1 分子の割合で混ぜ、キネシン分子をビーズ表面に結合させる。このキネシン付きビーズをレーザーにより捕捉して(レーザートラップ)、ガラス表面に結合した微小管の上に持っていく。すると ATP 存在下においてはビーズ上のキネシン分子が微小管と相互作用することによって方向性を持った運動を開始する。ビーズの動きとビーズに加わる力を  $\text{nm}\cdot\text{pN}$ ( $10^{-9}$  メートル、 $10^{-12}$  ニュートン)分解能で計測することによって、間接的にキネシン分子の運動を追跡することができる。キネシン分子は微小管と相互作用すると動きはじめるが、光ピンセットによって加えられる負荷が大きくなるにつれて次第に速度が低下し、ついにはつり合いの位置に達して一定の最大力  $7\text{pN}$  を維持しつつ変位しなくなる。しばらくするとキネシンは微小管から解離し、ビーズは捕捉中心の位置に戻る。この一連の相互作用を、実験温度を  $15^{\circ}\text{C}$  から  $35^{\circ}\text{C}$  までの範囲で変化させて行い、滑り速度、発生力、プロセッシブ性の温度効果を調べた。その結果、滑り速度は  $50\text{kJ/mol}$  のアレニウス活性化エネルギーで増加することが分かった。これは ATPase における温度依存性と同じ結果であった。また、平均移動距離、つまりキネシンのプロセッシブ性は、温度の増加に伴って増加した。一方で、キネシン 1 分子が発生する力に温度依存性は見られず、 $7.34\pm 0.33\text{ pN}$ (平均 $\pm$ 標準偏差。n=70)と一定であった。また滑り速度は、どの温度においても外部からの負荷が増加するのに伴いほぼ直線的に減少した。これはこの温度範囲では、メカノケミカルエネルギー変換の効率が温度に依存せずほぼ一定であることを示す。このように、力発生は温度に依存しないヌクレオチド結合状態または構造変化に起因しており、一方滑り速度は ATPase 活性によって決定されていることが示された。

第 4 章では、当研究室で開発された温度パルス顕微鏡(TPM)法をキネシン・微小管系に応用し、キネシン分子の動的・静的運動特性の研究を行った。TPM 法では、ガラス表面上に円形に蒸着したアルミニウムに対物レンズを通して赤外線レーザー( $\lambda=1.053\mu\text{m}$ )を集光・照射することによって、水溶液

中で局所的に温度パルスを与えることができる。TPM 法の一つの特徴は、約  $1^{\circ}\text{C}/\mu\text{m}$  の温度勾配を瞬時(ビデオレート内)に形成できる点にあるが、温度のリアルタイムイメージングは蛍光色素の熱消光の性質を利用して、微小管に結合したローダミンの蛍光強度を画像処理することによって行った。その結果、ガラス表面に吸着したキネシン分子を可逆的に短時間熱変調し、世界最高速の微小管滑り速度(約  $4\mu\text{m/s}$ ,  $48^{\circ}\text{C}$ )を記録した。また、微小管の後部の温度が高いときに、微小管に沿って細かいバックリング(座屈)現象が見られた。これはキネシン分子の ATPase 活性と滑り力が高温ほど大きいため、微小管が長軸に沿って圧縮されたために生じたものであろう。また少数個のキネシン分子を吸着したプラスチックビーズの微小管上での滑り運動についても、温度上昇に伴い同様の速度増加がみられた。このことから、1 分子であっても同様に熱励起されることがわかった。

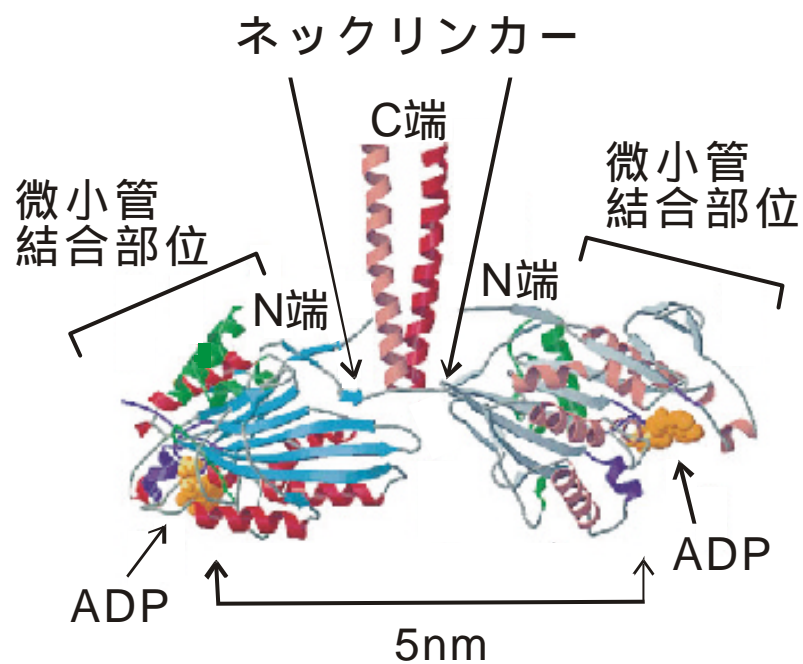
第 5 章では、1 分子の従来型キネシンが吸着したポリスチレンビーズを光ピンセットで捕捉・操作し、微小管に結合させた上で、微小管に平行に微小管のプラス端、あるいはマイナス端方向に負荷を加える。この結果の破断曲線や、破断直前の変位 - 負荷関係を解析することによって、キネシン・微小管複合体 1 分子結合の破断力と複合体の弾性率を求めた(図 1-4)。AMP-PNP 存在下( $<T,O>$  に対応)での破断力と弾性率は、ともに、ヌクレオチドなし状態(実験条件からみて  $<D,O>$  に対応)あるいは AMP-PNP と ADP との共存状態( $<D,T>$  に対応)で得られた値の 2 倍となった。この結果は、AMP-PNP 存在下ではキネシンは双頭結合であり、あとの 2 状態では単頭結合であるということを強く示唆している。

また、破断力の大きさは、プラス端よりもマイナス端方向に負荷をかけたときの方がヌクレオチド状態によらず約 1.4 倍大きかった。このように、キネシン・微小管結合は負荷を加えることで不安定化し、しかもそれが負荷の向きに関して非対称になっている。そこで、双頭結合状態では双頭ブリッジを通じての内部応力が存在すると仮定すると、プラス端側に負荷を受ける後ろの結合頭部が比較的不安定で、解離しやすい傾向にあると推測できる。この性質は、プラス端方向に動くキネシン分子モーターの歩行運動機能にとって重要な意味を持つものであると期待される。



第 6 章では、破断力分布の形が AMP-PNP 存在下のみならず、ヌクレオチドなし状態においても負荷上昇率や負荷の加え方、それに負荷の方向に依存することを述べる。ヌクレオチド状態や負荷の加え方に関係なく、微小管のマイナス端側に負荷をかけた時の破断力はプラス端にかけたときと比べて 45%大きい値となった。これらの結果は単頭と双頭の間に平衡が存在し、それぞれの結合寿命( $\tau$ )の負荷( $F$ )依存性を表す $\tau(F) = \tau(0)\exp(-Fd/k_B T)$ (ここで  $\tau(0)$  は無負荷状態での結合の寿命、 $d$  は特性距離であり、単頭、双頭の両方に依存する。モデルを用いて説明することができた)。モデル解析によって、単頭結合と双頭結合との間の遷移速度は、単頭 双頭結合遷移速度、双頭 単頭結合遷移速度それぞれ 2、0.2/s(AMP-PNP 存在下)、70、0.7/s(ヌクレオチドなし)と見積もられた。さらに、AMP-PNP 存在下においては、弾性率の急激な増加から単頭から双頭結合になる転移する瞬間を検出し、その転移速度は 1/s と見積もられた。これは上で得た値と一致する。このように一連の破断実験を通して、キネシン・微小管における単頭・双頭結合様式と、単頭・双頭結合間の転移についての知見を得ることができた。

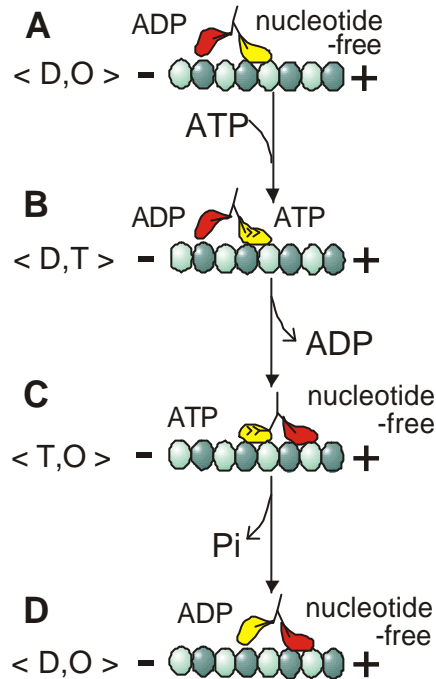
第 7 章では本論文の結果をまとめ、キネシンの 1 分子での機能解析の今後の展望について述べる。



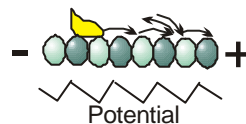
**図 1-1 キネシンの立体構造**

従来型キネシンの立体構造(Kozielski *et al.*, 1997)。ホモダイマーのN端側にある2つの頭部は、それぞれ同じ微小管結合部位とヌクレオチド(ATP/ADP)結合部位を持つ。両方の頭部にADPを結合している状態では頭部の間隔は約5nmである。

### 1. Hand-over-hand モデル



### 2. Biased Brownianラチェットモデル



**図 1-2 Hand-over-hand モデルと Biased Brownian ラチェットモデル**

1. さまざまな実験結果にもとづいて提案されている hand-over-hand モデル。キネシンがそれぞれのヌクレオチド状態で構造変化を起こし、単頭、双頭結合を繰り返す。O:ヌクレオチドなし(nucleotide-free)、D、T、Pi はそれぞれ ADP、ATP、無機リン酸を表わしている。 2. Biased Brownian ラチェットモデルの概念図。単頭キネシンと微小管との相互作用ポテンシャルとしてノコギリ歯状のものを仮定。ATP 加水分解とブラウン運動を巧みに利用しつつ一方向に進む様子を表わす。

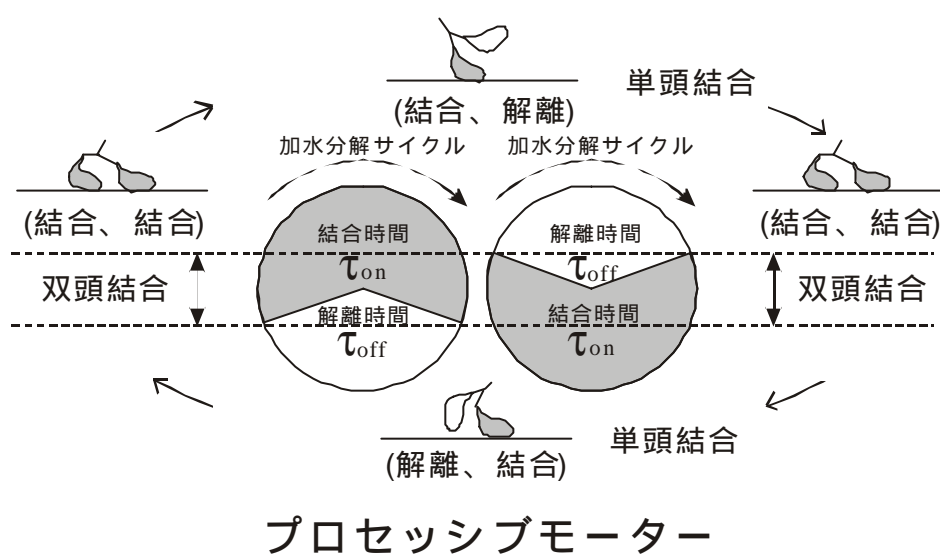
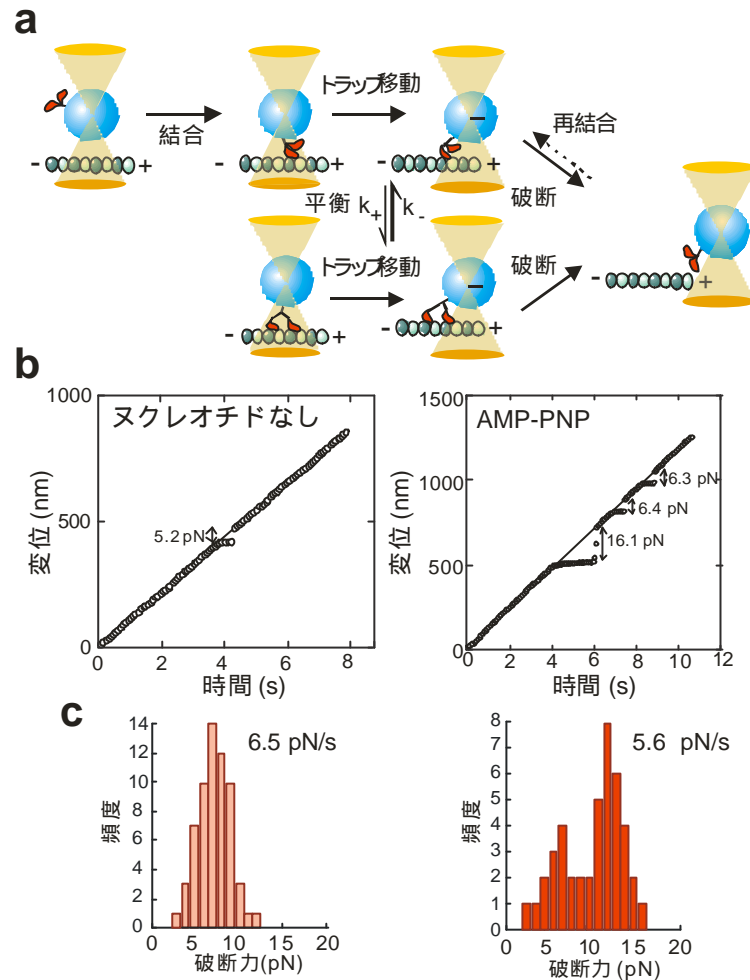


図 1-3 duty ratio の概念図

双頭構造を持つ分子モーターがプロセッシブに運動するためには、各頭部の duty ratio (1ATP 加水分解サイクルに占める結合時間の割合) は少なくとも 0.5 以上であることが必要。この図は、ATP 加水分解サイクルにおける 2 つの頭部の結合・解離のサイクルの位相が互いに 180 度ずれているという点で、頭部間の協調性を示している。



**図 1-4 光ピンセット法による 1 分子キネシンの運動・力学測定**

(a)キネシン 1 分子を吸着した直径 1  $\mu\text{m}$  のビーズを、ローダミンで蛍光標識した微小管上へと光ピンセットを用いて移動し、相互作用させる。さらに捕捉中心を一定速度で移動することによって、キネシン・微小管結合に負荷を加えると、結合が破断する。この測定はくり返し行うことができる。(b) 光ピンセットの捕捉中心(実線)とビーズ中心(丸印)の距離から、キネシンに加わる負荷を計算することができ、破断の際の負荷(破断力)の大きさから結合状態(強・弱、単頭・双頭)を特定することができる。また弾性率を見積もることもできる(Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)。特に AMP-PNP 状態では、一度破断が起こった後も、微小管に沿って捕捉中心を動かし続けると、再結合・再破断がくり返し起こる(図 a 参照)。(c)ヌクレオチドなし状態(左)と、AMP-PNP 存在下(右)での破断力分布(数字は負荷上昇率)。

## 【第2章】

### 実験系の概要

#### Materials and Methods

#### 2-1) 細胞骨格タンパク質の調製

##### 2-1-1) チューブリンとキネシン

微小管は多くの真核細胞に存在する太さ約 25nm の細長い管状構造体で、紡錘体の主要構成成分として染色体の分配に関与し、鞭毛や繊毛の運動構造体を形成し、また、物質の細胞内輸送のレールとして機能している。微小管は、主要構成物であるチューブリン( $\alpha$ ?、 $\beta$ ? サブユニットから成るヘテロダイマー、ダイマーあたり 2 分子の GTP あるいは GDP を結合している)が重合して管状構造をとったものである。微小管壁には多種類の非チューブリンタンパク質(微小管結合タンパク質、microtubule-associated proteins, MAPs と総称される)が結合している。MAPs はチューブリンの重合を促進し、再構成された微小管に結合して微小管の構造を安定化する活性を持つ。

キネシンとダイニンは、ATP 分解エネルギーを利用して微小管上を移動することによって、物質の輸送を行うモータータンパク質である。ダイニンには、鞭毛や繊毛の運動器官(軸系)に結合しているもの(軸系ダイニン)と、細胞質の微小管と相互作用して、細胞内の物質輸送にかかわるもの(細胞質性ダイニン)とがある。キネシンは微小管のマイナス端からプラス端(重合・脱重合が活発な端)方向に運動し、ダイニンは逆方向に運動する。

##### 2-1-2) チューブリンの調製

前日の準備：豚脳 3 個を注文(芝浦臓器、電話 03-3471-3371)

用意するもの

Waring ブレンダー、インキュベーター(37℃)、液体窒素、100mM ATP、  
100mM GTP

#### 溶液

Washing Buffer 500ml (注:1000ml のビーカーに入れる)

0.24M Sucrose

10mM MgCl<sub>2</sub>

10mM Na-Pi buffer (pH 6.8)

RB(reassembly buffer) 500ml (豚脳 4 個の時は 700ml)

10mM MES-NaOH (pH.6.8)

0.5mM MgSO<sub>4</sub>

100mM KCl

1mM EGTA

2mg/ml leupeptin

0.4mM PMSF

1mM DTT

うち 300ml は+1mM ATP、200ml は+1mM GTP。

Phosphocellulose (PC) カラム用の溶液

0.5N NaOH 500ml

0.5N HCl 500ml

#### Buffer A

100mM MES-NaOH (pH 6.8)

0.5mM MgCl<sub>2</sub>

1mM EGTA

PC 500ml

20mM MES-NaOH (pH 6.8)

0.5mM  $\text{MgCl}_2$

1mM EGTA

Buffer B      10ml

0.9M MES-NaOH (pH 6.9)

11mM  $\text{MgSO}_4$

1mM EGTA

Phosphocellulose(PC)カラムの作り方(前日までに作り終えているのが望ましい)

約 20ml のビーズ(粉)を 0.5N NaOH 500ml に加え、ガラス棒で混ぜる。5 分間放置。

?

上澄みを捨てて、DDW(Double Distilled Water)で数回洗う(Decantation)(この時、最終的に上澄みの pH が 11 になるまで)。

?

0.5N HCl 500ml に加えて、ガラス棒で混ぜる。5 分間放置。

?

上澄みを捨て、DDW で数回洗う(Decantation) (この時、最終的に上澄みの pH が 3 以上になるまで)。

?

カラムの用意。PC を洗っている間に、カラム(内径 40mm、高さ 130mm 程度のもの)を垂直に立てる。カラムの下部には長めのチューブをつけ、上から DDW を勢いよく流して、カラムとチューブにトラップされた空気を抜く。DDW を少しだけ残して待機する。

?

PC に BufferA を加え、pH を 6.8 にあわせる。懸濁液を脱気する(しなくても可)。

?



PC をカラムにつめる。攪拌した PC を勢いよくカラムに流し込む。PC が沈殿するのを待ち、足りない場合は上から静かに PC 懸濁液を加える。容量の目安は、カラムベッドボリューム 1ml に対して微小管タンパク質 2mg 以下とする。

？

カラムの平衡化(ここから 4°C)。カラムにビーズ体積の 2 倍量の PC 液を流す。続いて、ビーズ体積と等量の PC+GTP 液をカラムに流す。流速が早すぎるとカラムがつまるので注意。カラムの下部には長いチューブをつけ、チューブの先端をカラム液面近くまで持ち上げ、流速を調節する。1 秒間に 1 滴程度の流速にする。終わったら、そのまま冷やして待機する。

チューブリン精製当日の操作

溶液を作成し冷やす。

ローターと Waring ブレンダーを冷やす。

PC の活性化とカラムの平衡化をする。

冷却遠心機およびローター(500ml type)をよく冷やしておく。

？

3 個の豚脳の血管・膜を丁寧に取り除き、冷たい washing buffer で洗う。計量してから(約 300g)、包丁で薄切りにする。

？

等量の冷たい RB(ATP)を加え、ホモジナイズする(low speed、約 30 秒間)。

？

粗いゴミ落とし。500ml の遠心管 2 本につめ、遠心する(8,000rpm 20 分間, 2°C)

？

ゴミ落とし。sup(supernatant; 上澄みのこと)をさらに超遠心する(40,000rpm 40 分間, 2 °C)

？

sup をビーカーに移したのち、スターラーで混ぜながらそこに glycerol(sup.

の x1/3 vol)と ATP(final 1mM)を加え、37 °C で 20 分間放置して微小管を重合させる。この間にローターを 37 °C に暖める(以下同じ)。

?

微小管を集めるために超遠心する(40,000rpm 40 分間, 37 °C)。

?

ppt (pellet)を約 50ml の RB(GTP)に冷やしながらか、泡立てないように懸濁する(時間をかけて冷やすとよく溶ける。30 分間位)。ppt は柔らかいので注意する。この間にローターを冷やす(以下同じ)。

?

ゴミ落とし。超遠心する(40,000rpm 40 分間, 2 °C)

?

sup に ATP(final 1mM)と glycerol(sup.の x1/3vol.)を加え、37 C°で 20 分間放置して微小管を重合させる。

?

微小管を集めるために超遠心する(40,000rpm 40 分間, 37 C°)

?

ppt を約 25ml の RB(GTP)に冷やしながらか、泡立てないように suspend する(時間をかけて冷やすとよく溶ける)。

?

ゴミ落とし。超遠心する(40,000rpm 40 分間, 2 C°)

?

sup に ATP(final 1mM)と glycerol(sup.の x1/3vol.)を加え、37 C°で 20 分間放置して微小管を重合させる。

?

微小管を集めるために超遠心する(40,000rpm 40 分間, 37 C°)。

?

続けてカラムにかけるときは、ppt を PC+GTP 約 10ml に溶かす。チューブリン濃度を測る(100 ~ 150mg 程度取れているはず)。

カラムにかけないときは ppt を冷 RB(GTP)に溶かす。液体窒素で凍結させた後、-80 C°で保存する。後日、改めて重合・脱重合サイクルの精製を行っ

てから PC カラムにかける。

カラムにかける

？

サンプルロード。カラムの上を開放して、残っている PC+GTP を流し切った後、チューブリン溶液を PC カラムの上に乗せる。溶液がカラムの中に入ったら、カラムの上から PC+GTP を流す。

？

チューブリンの分取。溶出される液のタンパク質濃度をモニターし、濃度が上がり始めたら下がりきるまで分取する。チューブリンは PC カラムを素通りする。カラム体積の 1/3 から半分の溶液が流れたところでチューブリンが溶出される。溶出したチューブリンには x1/10vol の bufferB と x1/100 vol の GTP を直ちに加える。

？

濃縮。チューブリン濃度を測定する。薄い時には濃縮する(保存には 6mg/ml 以上欲しい)。セントリプラスを用いて遠心濃縮する(5000rpm 約 3 時間)。

？

保存。サンプルチューブに 30 $\mu$ l ごとに分注し、液体窒素で急速凍結後、-80°C で保存する。

### 2-1-3) 蛍光チューブリンの調製

溶液

x2 glycerol PB      10ml

160mM K-PIPES(pH6.8)

10mM MgCl<sub>2</sub>

2mM EGTA

2mM GTP

66% glycerol

60% glycerol H-pH buffer      20ml

0.1M NaHEPES(pH8.6)

1mM  $\text{MgCl}_2$

1mM EGTA

60% glycerol

40% glycerol H-pH buffer      20ml

0.1M NaHEPES(pH8.6)

1mM  $\text{MgCl}_2$

1mM EGTA

40% glycerol

x4 BRB      10ml

320mM K-PIPES

4mM  $\text{MgCl}_2$

4mM EGTA

60% glycerol BRB      4ml

x4 BRB

glycerol

DDW

チューブリンを重合させる。凍結しておいたチューブリン(60 ~ 80mg)を溶かし、x2 glycerol PB を 1:1 で加えて重合させる(37 °C、30 分間)この間に、60% glycerolを含む H-pH buffer をポリカーボン製の遠心管に半分満たし、あらかじめ 37 °Cに暖めておく。

?

微小管を沈殿させる。上記の 60% glycerol BRB80 のクッションの上に重合したチューブリンをのせ、遠心する(70,000rpm、30 分間)。

?

pH を上げる。クッションの上にある sup をアスピレーターで取り去る。クッションの境界面を H-pH buffer で丁寧に洗った後、クッションをアスピレーターで取る。ppt を 40% glycerol を含む H-pH buffer(あらかじめ 37 °C に暖めたもの)100 ~ 200µl に暖めながら懸濁する。懸濁する際には、先を切ったピペットチップを用い、懸濁した後さらに vortex をかける。この操作により白濁した微小管懸濁液(チューブリン濃度約 50mg/ml)が得られる。

?

染色する。1/10 vol の 100mM NHS-fluorochrome(in dry DMSO)を vortex しながら素早く加え、37°C で 2 分おきに vortex をかけながら 10 分間待つ。

?

反応を停止する。100mM potassium glutamate と 40% glycerol を含む x2BRB80 溶液を 2 倍量加えてよく混ぜる。

?

フリーの色素の除去。先ほどと同様の操作で微小管を沈殿させる。BRB80 buffer 200µl に懸濁して 0°C で 1 時間放置し、チューブリンを十分脱重合させる。その後、重合、脱重合のサイクルを 2 回繰り返す、最終的に脱重合させたものを液体窒素で急速凍結後、-80°C に保存する。

## 2-1-4) チューブリンの重合

チューブリン重合液

Tubulin assembly buffer (80mM PIPES、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EGTA、pH6.9)

+

[final] 1mM GTP

+

[final] 10% DMSO

(GTP、DMSO はいずれもチューブリン混合後の final)

-80°C で保存しておいたチューブリンを溶かす

?

チューブリン溶液を適量取り、そこに重合溶液を混ぜる(チューブリン 1 に対して溶液 1~4、チューブリン濃度による)。

?

37°C で 30 分間放置(この過程でチューブリンは重合する)。極性(プラス端、マイナス端)を判別できる蛍光性微小管を作製する場合には、蛍光標識したチューブリンのみを先に重合させ(5 分間程度)、その後蛍光標識していないチューブリンを混ぜ、30 分間放置する。

?

微小管を適当な溶液で薄める。目安は  $\times 1/200$  くらい。薄め液には[final]10 $\mu$ M の taxol を加えておく。

## 2-1-5) キネシンの精製

前日準備

予約 東京芝浦臓器 電話 03-3471-3371(牛脳 2 個)

溶液の確認

Leupeptin	10mg/ml 4.0ml
Trypsin inhibitor	10mg/ml 1.8ml
Aprotinin	10mg/ml 0.4ml
Pepstatin	2mg/ml(MetOH) 1.0ml
TAME	10mg/ml(DMSO) 0.4ml
TPCK	15mg/ml(MetOH) 1.0ml
PMSF	200mM(MetOH) 1.8ml
Taxol	10mM(5mg に DMSO を 0.6ml) 0.3ml
AMP-PNP	0.1M(25mg に 0.1M HEPES、pH7.4 を 0.5ml) 0.2ml
GTP	0.1M 2.5ml

## 溶液作成

### HB buffer 1.5L

100mM MES(pH6.7 KOH)	1M 150ml
2mM MgCl <sub>2</sub>	1M 3.0ml
2mM EGTA	0.1M 30ml
0.1mM EDTA	0.2M 0.75ml

### KB buffer 200ml

100mM PIPES(pH6.8 KOH)	0.5M 40ml
2mM MgCl <sub>2</sub>	1M 0.4ml
2mM EGTA	0.1M 4ml
2mM EDTA	0.2M 0.1ml

### 10GlyKB-ATP 50ml + Inhibitors

Glycerol	5ml
KB buffer	39ml
12.5mM MgCl <sub>2</sub>	1M 0.625ml
10mM ATP	0.1M 5ml
20μM Taxol	10mM 100μl
4mM DTT	1M 0.2ml

### 30Gly-KB 100ml + Inhibitors

Glycerol	33ml
100mM PIPES(pH6.8 KOH)	0.5M 20ml
2mM MgCl <sub>2</sub>	1M 0.2ml
2mM EGTA	0.1M 2ml
0.1mM EDTA	0.2M 50μl
0.1M NaCl	1M 10ml
20μM Taxol	10mM 200μl

4mM DTT

1M 0.4ml

50Gly-KB 100ml + Inhibitors

Glycerol

50ml

100mM PIPES(pH6.8 KOH)

0.5M 20ml

2mM MgCl<sub>2</sub>

1M 0.2ml

2mM EGTA

0.1M 2ml

0.1mM EDTA

0.2M 50μl

4mM DTT

1M 0.4ml

カラム類

x2 Stock Solution 200ml

40mM HEPES(pH7.5)

0.6M 13.3ml

4mM MgCl<sub>2</sub>

1M 0.8ml

4mM EGTA

0.1M 8ml

0.2mM EDTA

0.2M 0.2ml

Column Buffer

Buffer	A	B	C
Vol	80ml	40ml	40ml
NaCl conc.	50mM	100mM	250mM
1M NaCl	4ml	4ml	10ml
x2 Stock	40ml	20ml	20ml
DDW	36ml	16ml	10ml
Leupeptin	160μl		80μl

DEAE column (Merck Fractgel EMD DEAE-650(M))

(a) DEAE column をよく攪拌したあと、1ml を 10ml プラスチック試験管にとる

(b) DDW をいっぱいまで入れ、沈殿後上澄みを捨てる? x2 回



- |                                |    |
|--------------------------------|----|
| (c) 1M NaCl で sonic 3 分間       | x2 |
| (d) DDW                        | x2 |
| (e) 0.5M HEPES pH7.5           | x2 |
| (f) 50mM NaCl、20mM HEPES pH7.5 | x1 |
| (g) 使用直前まで低温室に保管               |    |

### シ ョ糖密度勾配遠心

Sucrose gradient solution f.100ml x2

Sucrose	5g & 20g
80mM PIPES(pH6.8 KOH)	0.5M 16ml
2mM MgCl <sub>2</sub>	1M 0.2ml
2mM EGTA	0.1M 2ml
0.1mM EDTA	0.2M 50μl
(直前に)1M DTT 0.1ml	
10mg/ml Leupeptin 0.1ml	
10mg/ml TAME 0.1ml	

牛脳 2 個を東京芝浦臓器に取りに行く。HB Buffer 室温・protease inhibitors を解凍しておく。遠心機を準備・1M DTT も準備しておく。

?

HB Buffer 1.5l に対して、1M DTT 6ml (final 4mM)、Inhibitors (別表)を加える。

?

脳をさっと水で洗い、次に HB Buffer で洗って、皮剥ぎ後細かく切る。脳 600g + HB Buffer 450ml ? ホモジナイズ(25 秒 x2)

?

遠心(ゴミを落とすため)500ml x4 (7k 4℃, 75 分間)。500ml ビーカーを冷やしておく。

?

sup を 500ml ビーカーにいったんあけた後、75ml チューブに移す。? 遠心(ゴ

ミを落とすため)75ml x6 (35k 4°C, 80 分間)。インキュベーターを 33°C に  
セットし、GTP も溶かしておく。500ml コニカルビーカーの準備もしてお  
く。

?

sup + 1/2 vol glycerol (sup 300ml + glycerol 150ml) ? final 450ml

+ 0.1M GTP 2.5ml (final 0.5mM)

+ 1 M MgCl<sub>2</sub> 1ml (final 2mM)

? 33°C 30 分間インキュベートする(ときどき攪拌)

洗面器にお湯を張って、遠心ローターを暖めておく。

?

Apyrase 100U/ml 2.5ml (1/200 v/v)

0.1M AMP-PNP 200μl (1/2500 v/v)

? 33°C 20 分間 インキュベートする。

遠心ローターを遠心機に移し、真空を引いておく。

?

キネシンの結合している微小管を沈殿させるため、75ml x6 (40K 25°C 50  
分間)で遠心する。500ml のビーカー(sup 廃棄用)、2ml の駒込ピペット、短  
いパスツールピペット、50Gly-KB のベッド(35ml) x2 本の用意。

?

(ppt を洗う)少量の KB Buffer で管壁を洗った後、30Gly-KB(各 10ml/チュー  
ブ)で懸濁する(初め駒込ピペットを使用、細かくなったらパスツールピペ  
ットを使用する)。50Gly-KB のベッド(35ml)の上に半分ずつのせる(秤にの  
せながらやると楽に行える)。

?

75ml x2 (40k 25°C, 50 分間) で遠心。

#### DEAE カラムの組み立て

Leupeptin を buffer に加える。

A に Leupeptin (10mg/ml) 120μl(60ml に対して)

C 80μl(40ml に対して)

カラムを、フラクションコレクターの UV モニター部の高さに固定する。  
カラムに bufferA をのせて、うまく液体が流れることを確認する。  
フラクションコレクターの動作確認後、洗ったカラムの粉を全量カラムにのせる。  
自然落下で溶液を流出させ、カラムをつめる  
bufferA 数 ml で洗い、低音室で使用直前まで保管しておく。

(先程の遠心での)sup を捨てる。

?

ppt を KB で 2 回洗った後、10Gly-KB-ATP を(各 5ml/チューブ)で懸濁(液はほんのり白っぽい)? 室温放置 20 分間(ATP が含まれているため、キネシンが微小管から解離する)。

?

遠心(微小管を落とすため) 75ml x2 (35K 20°C, 65 分間)の後、Bradford 法でタンパク定量。

DDW	795 $\mu$ l
Sample	5 $\mu$ l
BIORAD 溶液	200 $\mu$ l

混ぜた後 10 分後に ABS<sub>595</sub> を測る(base は DDW 800 $\mu$ l + BIORAD 200 $\mu$ l で差引く)

? 値 x 3.55=タンパク濃度(mg/ml) (通常は Abs<sub>595</sub> ~ 0.2 ? 約 0.7mg/ml)

DEAE カラムを A-Buffer(+LP) 1ml で洗う。

?

先程の 10Gly-KB-ATP 溶液で遠心した sup を約 13drop/min の速さで 30 分間かけて load。ふたを切ったサンプルチューブを 30 個用意し、load が終わったら set する。

?

B-Buffer 5ml ぐらいで洗う(LP なしで構わない)。B-Buffer をのせたらサンプ

ルを採り始める。

(15drop(=約 600 $\mu$ l)/サンプルチューブ)。レンジ 0.5、記録 10mV、速度 12cm/h  
?

C-Buffer でゆっくり (5~6drops/min) elute する。使い終わった後、チューブ  
をまず 1M KCl(7.26g/100ml)で洗った後、DDW で洗う。

?

タンパク定量(上記と同じ)ピーク 2~3 本を混ぜ合わせる。

ピーク濃度は  $ABS_{595}=0.13$ ? 約 450 $\mu$ l

?

sucrose gradient bed をつくる(DTT/LP/TAME を忘れずに)

出口が付いているほうに 20%とスターラーを入れ、もう一方に 5%を入れる。

出口にはチューブを介してペリスタポンプをつけて、ゆっくりと引く

?

sucrose bed の上にサンプルをのせ、Swing Rotor(SW)で遠心(28K 4°C 19.5  
時間)。

?

翌日、遠心機を停止させ、ふたを切ったサンプルチューブを 60 個用意し set  
する。

?

フラクションコレクターで遠心チューブの底から吸引(勾配を乱さぬよう注  
意(15drop/サンプルチューブ) レンジ 0.5、記録 10mV、速度 12cm/h

?

電気泳動(結果を図 2-1 に示す)、タンパク定量(ピーク濃度は  $ABS_{595} \sim 0.27$ ?  
約 100 $\mu$ g/ml)、gliding assay を行い活性の有無を確かめる。

?

液体窒素で冷凍保存する。

## 2-2) 顕微解析系について

キネシンと微小管の相互作用を測定するために使用した顕微鏡システム

は、以前に西坂らによって報告されたものである(Nishizaka *et al.*, 1995)。倒立顕微鏡に光ピンセットシステムや、位相差像と微小管の蛍光像を同時に観察できる dual-view 蛍光顕微鏡システム(Miyata *et al.*, 1994; Kinoshita *et al.*, 1991)を備えている位相差像によるポリスチレンビーズの輝度重心をフレームメモリーコンピューター(DIPS-C2000; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)で計算し、ビーズの重心を 5nm の精度で求めた。光ピンセットのばね定数は西坂らの方法(Nishizaka *et al.*, 1995)を用いて、0.087pN/nm と見積もった。

## 2-2-1) キネシンビーズアッセイ

本論文において行った *in vitro motility assay* の実験は、キネシンをガラス面に吸着させて微小管にその上を走らせる”微小管滑り系”と、キネシンつきビーズをガラス面に吸着させた微小管にと相互作用させる”ビーズアッセイ”の 2 種類であり、どちらも分子モーターの研究において基本的なものである。ここでは一般的なビーズアッセイのプロトコルを紹介する。各実験におけるフローチャンバーの作成方法や使用した試薬、光ピンセットの操作方法については各章における”材料と方法”を参照。

[カゼイン溶液] 20ml(100mM NaCl, 10mM Tris, pH ~10, 室温) + 0.2g 粗 casein をスターラーで 5 分間混ぜたもの(pH~7.8 になる)を 4°C, 18K で 10 分間遠心し、氷の中で保存する(1 週間は使用できる)。

4ml アッセイバッファー(2mM MgCl<sub>2</sub>, 80mM PIPES, 1mM EGTA, pH6.8) +  
1ml カゼイン溶液(~5mg/ml).....

920μl + 80μl 2% ビーズ(1 時間放置).....

1000μl + 1μl キネシン(100(g/ml) (キネシン濃度は 0.1μg/ml).....

100 $\mu$ l + 2 $\mu$ l + 100 $\mu$ l .....

すばやく混ぜ、20 分間放置(3 時間保存できる)

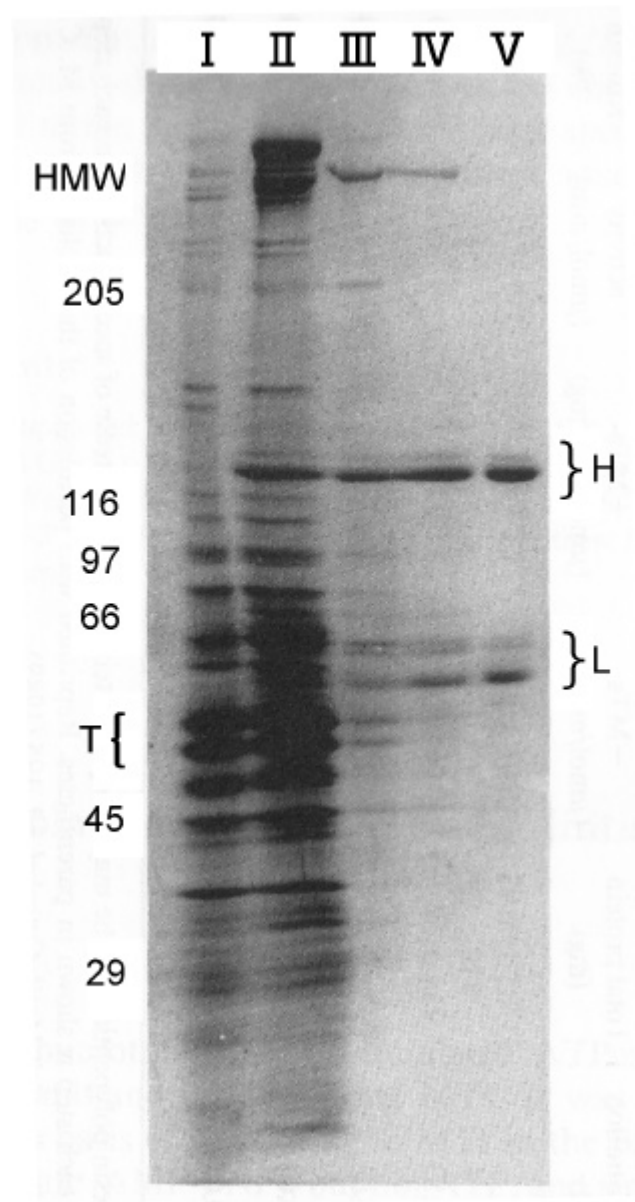
[微小管]100 $\mu$ l アッセイバッファー + 1mM taxol + 0.2 $\mu$ l 微小管(2-1-4 参照)  
を 10 $\mu$ l フローチャンバーに流し、2 分間放置。

100 $\mu$ l + 0.5 $\mu$ l taxol.....

を 10 $\mu$ l ずつ 3 回フローチャンバーに流し、2 分間放置。

?

85.5 $\mu$ l + 10mM dithiothreitol, 4.5mg/ml glucose, 0.22mg/ml glucose  
oxidase, 0.036mg/ml catalase, 10 $\mu$ M taxol をそれぞれ 0.5 $\mu$ l + 10 $\mu$ l  
ATP(5mM) + 2 $\mu$ l



**図 2-1 キネシン精製過程における、各段階での電気泳動 (SDS-PAGE)の様子。**

は牛脳の cytosolic extract を示している。 はキネシンを結合した微小管を ATP で洗ったときに得られたものであり、 は gel-filtration をかけた後のもの、 はイオン交換カラムをかけたものである。最後に はショ糖密度勾配で得られたものである。HMW は high-molecular-weight MAPs、T はそれぞれチューブリンの  $\alpha, \beta$  サブユニット、H,L はそれぞれキネシンの重鎖、軽鎖を示している。残りの左側に示している数字は分子量(kDa)である。

## 【第3章】

### キネシン 1 分子の発生力、速度、プロセッシブ性の温度依存性

Temperature dependence of force, velocity, and processivity of single kinesin molecules

#### 3-1) 序文

光ピンセットによるビーズアッセイ法を用いて、15°C から 35°C の間でのキネシン 1 分子の微小管上での滑り速度、発生力、プロセッシブ性の温度効果を調べた。滑り速度は 50kJ/mol のアレニウス活性化エネルギーで増加した。これは ATPase における温度依存性と同じ結果であった。また、移動距離の平均、つまりキネシンのプロセッシブ性については、温度の増加に伴って増加した。一方で、キネシン一分子が発生する力に温度依存性は見られず、 $7.34 \pm 0.33$  pN(平均 $\pm$ 標準偏差。n=70)と一定であった。また滑り速度は、温度によらず外部からの負荷が増加するに伴い直線的に減少した。このことはこの温度の範囲では、メカノケミカルエネルギー変換の効率は一定に保たれていることを示す。このように、力発生は温度に依存しないヌクレオチド結合状態または構造変化に起因しており、一方滑り速度は ATPase によって決定されていることが示された。

#### 3-2) 研究の背景

神経細胞において、ミトコンドリアやシナプス小胞のオルガネラは生理的温度において 2 ~ 4 $\mu$ m/s の速さで数ミクロンもの距離を移動することが知られている(Brady, 1985; Grafstein and Forman, 1980; Lasec *et al.*, 1984)。この動きは速い軸索流に区分され、他の細胞で観察されている小胞輸送と同様のものである。キネシンはそのような速い軸索流として順行性の微小管に沿った(微小管のプラス端方向に進む)細胞内部の動きを担っており、エネルギー



ギー源として ATP の加水分解を必要とする(Howard *et al.*, 1989)。キネシンの重要な性質はプロセッシブ性のモータータンパク質であることである:1 分子のキネシンで微小管表面に沿って連続的に長距離にわたって移動することができる(1 $\mu$ m、1 秒程度)。キネシンは微小管を 8nm のステップで移動していき、室温においては最大 5 ~ 8pN の力を発生する(Howard *et al.*, 1996; Block *et al.*, 1990; Svoboda *et al.*, 1993; Vale *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 1997)。

一般的に、化学反応は高温におけるほうが早く進む。キネシン分子と相互作用する微小管の滑り速度は、温度の増加に伴って速くなることが知られている(Böhm *et al.*, 2000; Mazumdar and Cross, 1998)。しかし、この性質はキネシン 1 分子のレベルでは調べられてはいなかった。キネシンは 1 分子で機能するタンパク質なので、今や 1 分子での実験は必要不可欠なものとなっている。そこで、1 分子のキネシンの温度特性を調べるため、光ピンセットを用いた 1 分子ビーズアッセイを行った。牛脳から精製した天然のキネシンを 1 つのビーズに結合させ、光ピンセットを用いてガラス面に吸着している微小管と相互作用させた(Svoboda *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997)。化学反応速度は温度の上昇とともに増大するというアレニウスの法則から予想される通り、ビーズの変位から測定されたキネシン 1 分子の滑り速度は 35°C まで定常的に増加し、それに対応するアレニウスプロットは直線であった。キネシンが微小管から離れることなく移動する距離(run length)は高温になるほど増加し、細胞内輸送を担っているキネシンとしてふさわしい性質を持っていることが明らかとなった。また、力発生の温度による効果も調べた。興味深いことに、キネシン 1 分子による最大発生力は、温度を 15°C から 35°C に変化させても不変であった。この結果は、キネシンの力発生機構は、温度に関係なく一定の効率を出せるようにプログラムされていることを示唆している。この結果に関しては、第 43 回米国生物物理学会で予備報告を行った(Kawaguchi and Ishiwata, 2000)。

### 3-3) 材料と方法

### 3-3-1) タンパク質

キネシンは小嶋らの方法を用いて牛脳から精製した(Kojima *et al.*, 1997)。チューブリンは Hyman (Hyman, 1991)の方法に従って豚脳から精製し、ローダミン (tetramethylrhodamine succinimidyl ester, C-1171 Molecular Probes, Eugene, OR)で標識した。微小管は 40 $\mu$ M の taxol で安定化した。

### 3-3-2) ビーズアッセイ

キネシンをコートしたビーズの作成は小嶋らの方法を参考にし、蛍光ラテックスビーズを用いた(直径 1 $\mu$ m、calboxylate-modified latex; yellow-green, F-8823; Molecular Probes)(Kojima *et al.*, 1997)。微小管と相互作用できるキネシンつきビーズの活性は、Svoboda らによる統計的手法を用いた(Svoboda and Block, 1994)。全ての実験には、キネシンとビーズの混合比を 1:1 で調製したものをを用いた。

### 3-3-3) ビーズアッセイ用フローセルの作り方

最初に、フローセル内に蛍光標識した微小管を流し込み、セルのガラス表面に微小管を吸着させるために 2 分間待つ。その後セル内をアッセイバッファ(2 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), pH 6.8), 1 mM EGTA, 0.7 mg/ml filtered casein (073-19, Nacalai Tesque, Kyoto)で洗い、吸着していない微小管を取り除き、カゼインでガラス面をコートするために 2 分間待つ。最後に、キネシンつきビーズと酸素除去系(Harada *et al.*, 1990)を含んだアッセイ溶液でチャンバーを満たし、[約 0.1pM kinesin-coated beads, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM PIPES (pH 6.8), 1 mM EGTA, 0.7 mg/ml filtered casein, 1 mM ATP (127531, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 10  $\mu$ M taxol (T-1912, Sigma, St. Louis, MO), 10 mM dithiothreitol (DTT), 4.5 mg/ml glucose, 0.22 mg/ml glucose oxidase (G-2133, Sigma), 0.036 mg/ml catalase (C-10, Sigma)]マニキュア

でシールする。他の試薬は全て特級を用いた。

### 3-3-4) 顕微鏡

キネシンと微小管の相互作用を測定するために使用した顕微鏡システムは、以前に西坂らによって報告されたものである(Nishizaka *et al.*, 1995)(2章参照)。

### 3-3-5) 温度コントロール

15、20、25℃での実験においては、エアコンで室温をそれぞれの温度に設定して行った。30 と 35 の実験においては、thermal insulation chamber (Nikon)を用いて顕微鏡のステージ全体(フローセルも含む)を覆い、温度をコントロールした。温度は顕微鏡のステージのフローセル近くに設置したサーミスタ(温度計)で測定し、 $\pm 1^{\circ}\text{C}$  の精度で調節した。レーザービームによってビーズを捕捉することでビーズの温度が局所的に増加してしまっているかどうかを調べるために、微小管に結合しているローダミンの蛍光強度の熱消光を調べたが、変化はなかった、つまり光ピンセットで捕捉することによる局所的な温度の増加は見られなかった(Kato *et al.*, 1999; Kawaguchi and Ishiwata, 2000)。ビーズアッセイは、それぞれの温度にフローセルを入れてから 1 分間経過した後に行った。

### 3-3-6) 1 分子キネシンつきビーズの滑り速度の測定

まず、光ピンセットによって 1 分子のキネシンが結合したビーズを捕捉し、フローセルのガラス面に吸着している微小管と相互作用させる。キネシンと微小管が相互作用しているのを確認した後、レーザーのシャッターを OFF にすると微小管のプラス端方向にビーズの移動が起こる。この運動をビデオに録画(30 frames/s)し、ビーズの変位を求めた。この変位は時間に対してほぼ直線的なので、平均の滑り速度は変位と時間の関係の傾きから求め

た。

### 3-3-7) キネシン 1 分子による力発生

速度計測の時と同様に、キネシンと微小管を相互作用させ、今度はレーザーを切らずにそのままにしておく。すると、キネシンが微小管のプラス端方向に動き、ビーズが引っ張られる。キネシンが発生する張力と光ピンセットの力がつりあうと、ビーズはある一定の位置を中心にゆらぐようになる、キネシンが微小管から解離すると、急にビーズはもとの捕捉中心にもどる。時々、一定の負荷レベルに達する前にビーズが捕捉中心に戻る時がある。この場合はキネシンが最大張力を出す前に相互作用が終わってしまったと判断して、結果から除いた。これらから求めたビーズの変位に光ピンセットのばね定数をかけて、最大発生力を求めた。

### 3-3-8) 力？ 速度曲線の測定

キネシン 1 分子の発生力と速度の関係を求めるために、力発生測定で得られた 7 つのビーズの変位の時間経過をそれぞれの温度で平均した(重ね合わせて平均化)。各発生力における速度は、平均化した曲線の、1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-7.5 pN 間での平均の傾きから求めた(図 3-2a)。無負荷(0pN)での速度は図 3-1 の結果を用いた。外部から負荷がかかっているときのキネシン分子の滑り速度を正確に求めるためには補正が必要で、 $1 + (\text{光ピンセットのばね定数}) / (\text{キネシン・微小管複合体の硬さ})$  の値を掛けなければならない(Kojima et al., 1997)。しかし、キネシン・微小管複合体の硬さは、我々の実験より 0.4pN/nm と見積もられており(Ishiwata and Kawaguchi, 2000)、光ピンセットのばね定数の 0.087pN/nm よりも数倍大きいので、補正は行わなかった。従って、我々が見積もった速度は無負荷状態を除き幾分過小評価している可能性があるが、その程度は 20%程度であると見積もられる。

### 3-4) 実験結果と考察

### 3-4-1) 滑り速度に対する温度効果

初めに、無負荷状態におけるビーズの滑り速度の温度依存性を調べた。図 3-1b に示すように、この温度範囲におけるアレニウスプロットは直線となった。また、アレニウスプロットの傾きから活性化エネルギーは 50kJ/mol と見積られ、キネシンに微小管を加えた時の ATPase 活性(microtubule activated ATPase)の温度依存と一致した。このようにして得られた(アレニウス)活性化エネルギーはアクトミオシンの *in vitro* で実験において得られた値と同様のものではあった(Anson, 1992; Homsher *et al.*, 1992; Winkelmann *et al.*, 1995)。しかし、40℃以上では、thermal insulation chamber 内にセルの温度を平衡状態にするのに必要な時間(1 分間)のうちに、タンパク質の失活が起こるために滑り運動は観察できなかった。

最近、Böhm 等は(Böhm *et al.*, 2000)、微小管の滑り速度のアレニウスプロットは 27℃ で折れ曲がり、<27℃ においては 65kJ/mol、>27℃ では 9kJ/mol と報告した。彼等はこの折れ曲がりにはキネシンか微小管、もしくはその両方の構造変化(De Cuevas *et al.*, 1992)のためであると結論づけている。一方、我々の結果には 27℃ 付近に折れ曲がりは見られなかった(図 3-1a)。その上、温度パルス顕微鏡法を用いて 35℃ から 50℃ までの温度依存性を測定した予備実験においても(Kawaguchi and Ishiwata, 2000; 第 4 章参照)、27℃ 付近に折れ曲がりは見られず、活性化エネルギーも 50kJ/mol と一定であった。Böhm らの実験を含む以前に行われた実験(Böhm *et al.*, 2000; Mazundar and Cross, 1998)は 1 分子測定ではなくて多分子であるために、いくつかのキネシン分子が熱のためにダメージを受け、それが負荷となって微小管のスムーズな運動を妨げているのではないかと考えられる。実際、30℃ において 10 分以上、また 40℃ においては 1 分以上経過すると、失活によってキネシンの速度が徐々に遅くなっていき、より低い値しか得られなかった。

### 3-4-2) プロセッシブ性に対する温度効果

滑り速度を測定したデータと同じものを用いて、run length(=ステップの数とステップサイズ(8nm)をかけたものであり、キネシン 1 分子が微小管上を離れることなく移動する距離)を見積もった。データの数が少ないため、他の文献にあるような指数関数的な曲線(Block *et al.*, 1990; Vale *et al.*, 1996)にはならなかったが、温度を 15°C から 35°C まで増加すると run length も 0.7 から 1.5 $\mu$ m へと単調増加した。これはキネシンのステップにおける解離の確率は温度が増加するに従ってより小さくなっていることを示しており、キネシンの微小管への結合状態を安定化するには疎水的な相互作用が重要であることが示唆される。しかし、相互作用している時間は温度の増加とともに減少していることに注意しなければならない。つまり、15°C では 2 秒であったのが 35°C においては 1 秒になっている。このような run length の温度依存性は、体温においてオルガネラ等を長距離にわたって運ぶという役目を担っているキネシンの細胞内輸送機能にとって重要である。

### 3-4-3) 発生力の温度依存性

次に、ビーズを光ピンセットで捕捉することによって外部から負荷を加えた。図 3-2a と b はそれぞれ 20°C と 35°C において、ビーズが捕捉中心から移動する様子を示したデータである。図 3-2c は 20°C と 35°C におけるビーズの平均の変位を示している。プラトーレベルに 0.1 秒以上滞在した 7 つのビーズの変位のトレースを重ね合わせてそれぞれの温度で平均した。この平均曲線から明らかなように、滑り速度は外部からの負荷の増加とともに徐々に減少した。この二つの温度において明らかに異なるのは立ち上がりでの速度である。また、力発生の始まりから終わりまでの時間は高温であるほうがより短いことが分かった。7 つのデータを平均して得られた時間は(図 3-2a と b 参照)、15、20、25、30、35°C において、それぞれ  $1.03 \pm 0.25$  (平均 $\pm$ 標準偏差)、 $0.82 \pm 0.18$ 、 $0.73 \pm 0.12$ 、 $0.69 \pm 0.21$ 、 $0.58 \pm 0.18$ s であった。このように、結合状態の lifetime は外部から負荷をかけることによって短くなる。

図 3-3 にまとめたように、プラトーレベルにおける定常的な発生力は

15°C から 35°C の間では一定であり、 $7.34 \pm 0.33$  pN(平均 $\pm$ 標準偏差,  $n=70$ )となった。以上の結果をもとにして、キネシン分子の発生力は温度に依存しないヌクレオチド結合状態またはキネシン・微小管複合体の構造変化に起因しており、一方滑り速度はATPaseによって決定されていると推論することができる。最近、アクトミオシン(Heavy Meromyosin)複合体の最大発生張力が、1分子レベルでの実験ではないが、キネシンの結果と同様に、同じ温度の範囲でほぼ一定であるという結果が得られた(Kawai *et al.*, 2000)。このように、温度に依存しない発生力と温度に依存する滑り速度は分子モーターに共通する特徴なのかもしれない。

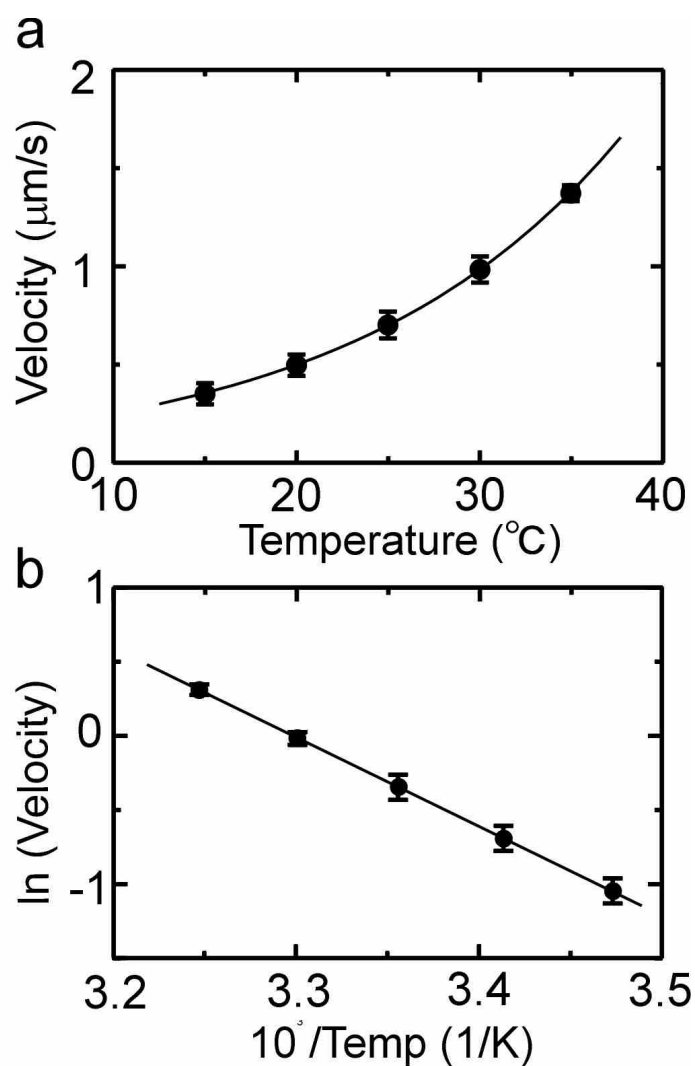
#### 3-4-4) 力？ 速度関係の温度依存性

図 3-4 にいくつかの温度における 1 分子のキネシン分子の発生力 速度関係を示した。各発生力における速度は、図 3-2c に示したようなビーズ変位の時間経過において、1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-7.5 pN における平均の傾きから求めた。図 3-4 の縦座標と横座標上の値はそれぞれ図 3-1 a と図 3-3 から求めた。図 3-4 に見られるように、力？ 速度曲線は全ての温度においてほぼ直線となった。このような力と速度の直線関係は室温においてすでに報告されている(Kojima *et al.*, 1997; Svoboda *et al.*, 1994; Mayhöfer *et al.*, 1995)。

モーターがする最大の仕事(= force  $\times$  working distance)はATP1分子の加水分解に伴う自由エネルギーの減少の大きさによって制限されていて、その値は $\sim 25$  kT または $\sim 100 \times 10^{-21}$  J である。キネシンの場合ステップサイズは8nm なので、力は12 pN以下と予想される。我々のデータにより、1分子のキネシンは、温度に関係なく7pNの力を発生出来る(図3-3)。したがって、1つのATP分子の加水分解によって1ステップ進むとすると、エネルギー変換効率は、最大の仕事が $7 \text{ pN} \times 8 \text{ nm} = 56 \times 10^{-21}$  J となるので60%以下と見積もられる。その上、滑り速度とATPase活性は(少なくとも外部からの負荷がない時は)温度の増加と共に増加していったことから、メカノケミカルエネルギー変換の効率は温度に依存しないといふようである。分子モーターは、

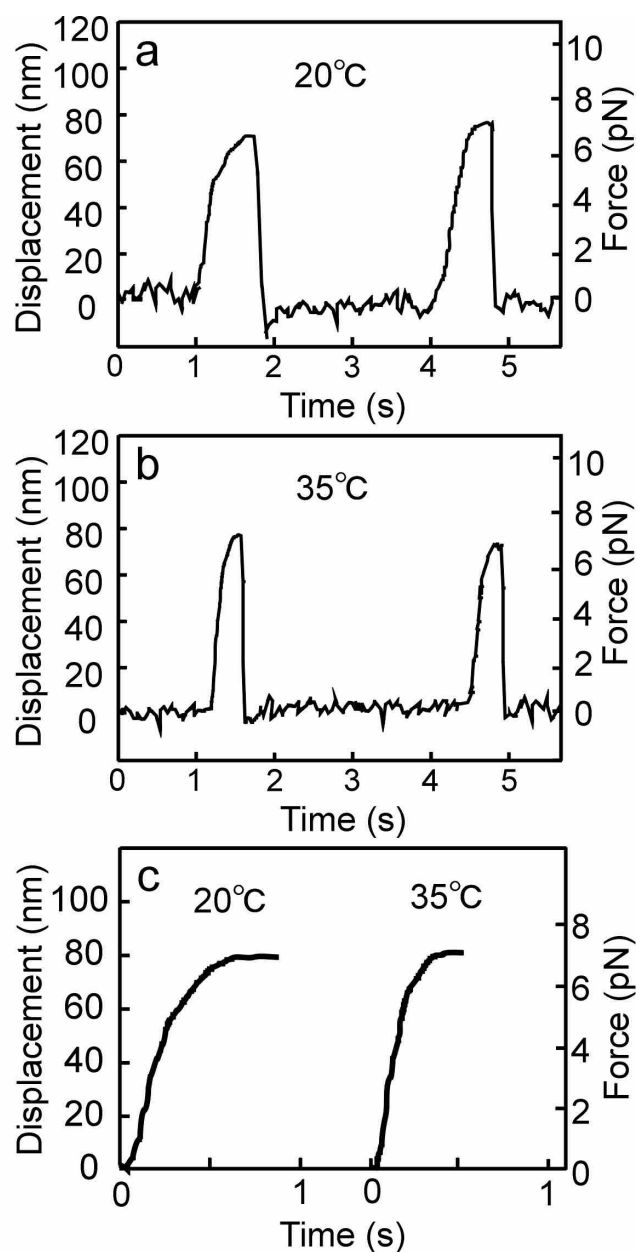
どんな温度においても一定の効率で機能できるようにプログラムされているのかもしれない。





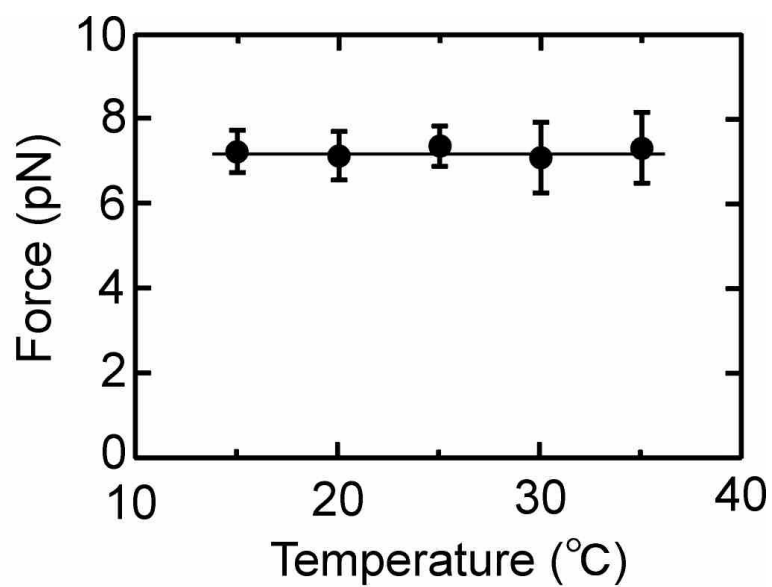
**図 3-1 ビーズに結合したキネシン 1 分子の滑り速度の温度依存性**

(a)滑り速度と温度の関係。(b)図 a のアレニウスプロット。エラーバーはそれぞれの温度で 7 回測定したデータの標準偏差を表わしている。ビーズの速度(平均 $\pm$ 標準偏差)は、それぞれ  $0.35 \pm 0.04$  ( $15^{\circ}\text{C}$ )、 $0.50 \pm 0.05$  ( $20^{\circ}\text{C}$ )、 $0.71 \pm 0.07$  ( $25^{\circ}\text{C}$ )、 $0.99 \pm 0.07$  ( $30^{\circ}\text{C}$ )、 $1.36 \pm 0.04$  ( $35^{\circ}\text{C}$ )  $\mu\text{m/s}$  であった。溶液条件:アッセイバッファー(2 mM  $\text{MgCl}_2$ 、80 mM PIPES (pH 6.8)、1 mM EGTA、0.7 mg/ml filtered casein、10 mM DTT、1 mM ATP、酸素除去系)



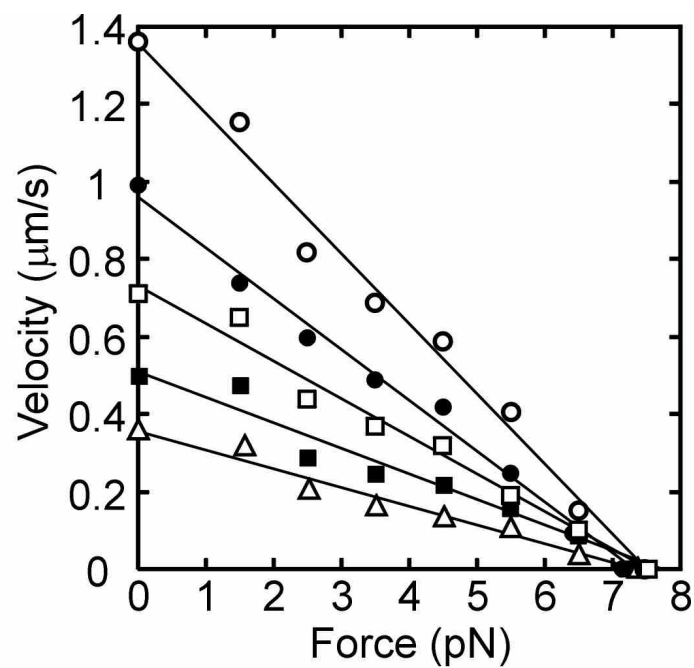
**図 3-2 ビーズに結合したキネシン 1 分子の力発生の時間経過**

(a と b) 20°C と 35°C における光ピンセットの捕捉中心からビーズが動いていく様子 of 生データ。(c) 20°C と 35°C のデータの平均 ( $n=7$ )。プラトーの部分が 0.1s 以下のデータも含む。ビーズの変位から求められた力は、右の縦軸に示されている。溶液条件は図 3-1 と同じ。



**図 3-3 ビーズに結合したキネシン1分子の最大発生力の温度依存性**

最大発生力(平均±標準偏差)は、15, 20, 25, 30, 35 °C で、それぞれ  $7.38 \pm 0.45$  (n = 12)、 $7.21 \pm 0.57$  (n = 16)、 $7.50 \pm 0.47$  (n = 25)、 $7.16 \pm 0.83$  (n = 10)、 $7.43 \pm 0.83$  (n = 7) pN。溶液条件は図 3-1 と同じ。



**図 3-4 発生力？速度関係の温度依存性**

下から上に向かって、15°C(白三角)：20°C(黒四角)：25°C(白四角)：30°C(黒丸)：35°C(白丸)。各発生力における滑り速度は図 2c におけるビーズの変位の平均の傾きから求め、その範囲はそれぞれ 1-2、2-3、3-4、4-5、5-6、6-7 pN とした。無負荷時(力=0)での速度は図 3-1 の値を、最大発生力(速度=0)は図 3-3 の値を用いた。溶液条件は図 3-1 と同じ。

## 【第4章】

### 温度パルス顕微鏡法によるキネシン 1 分子の熱励起

Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy

#### 4-1) 序文

キネシンは ATP 加水分解のエネルギーを用いて、微小管に沿って‘歩いて’進んでいくプロセッシブ性のモータータンパク質である。第 3 章でまとめたように、著者らはビーズアッセイを用いて 15°C から 35°C の間でのキネシン 1 分子の移動速度、発生力、プロセッシブ性を研究した(Kawaguchi and Ishiwata, 2000)。しかし、熱によるダメージの為に、35°C 以上での温度の効果は測定することが出来なかった。そこで、温度パルス顕微鏡(Temperature Pulse Microscopy; TPM)(Kato *et al.*, 1999)を用い、微小管と相互作用しているキネシンの滑り速度を、35°C から 50°C まで(瞬間的には ~60°C)という高温で測定した。そこで得られた最大の速度は 3.68 $\mu\text{m/s}$  で、今まで報告された従来型キネシンの速度としては最速であった。アレニウスプロットは 15°C から 50°C の間において一定の活性化エネルギー(約 50kJ/mol)を示した。このことは、キネシンの分子メカニズムが、生理的な温度だけでなくさまざまな温度において共通であることを示唆する。

#### 4-2) 研究の背景

キネシンは真核細胞内で微小管に沿ってさまざまな種類の物質を運搬するモータータンパク質である(Vale *et al.*, 1985; Howard, 1996; Hirokawa, 1998; Vale, 1999)。ミオシン(ミオシン V を除く)、ダイニンとの大きな違いは、キネシンは 1 分子で微小管上を移動していくことができるという点にある(Howard *et al.*, 1989; Block *et al.*, 1990; Vale *et al.*, 1996)。キネシンの運動性については様々な面からの研究が進んでいるが、ここでは前章と同様

温度の効果を調べた。前章では、ビーズアッセイを用いて 15°C から 35°C の間でのキネシン 1 分子の移動速度や発生力、それにプロセッシブ性について研究した(Kawaguchi and Ishiwata, 2000)。しかし、35°C を超える温度においては、保温箱での温度制御法を用いたために時間がかかりすぎ、タンパク質が変性してしまうために信頼できるデータを得ることが出来なかった。

微小管とキネシンの相互作用を生理的温度を含むより高い温度で調べるために、以前に我々の研究室で開発した温度パルス顕微鏡法(TPM)を応用し(Kato *et al.*, 1999)、ガラス面に吸着しているキネシンの上を移動する微小管の滑り速度を測定した。温度パルス顕微鏡法は、ガラス表面に蒸着した薄い金属層に赤外レーザーを照射することによって、温度を局所的かつ短時間に上昇・下降させることができる。レーザー照射された金属層を中心として、数十 $\mu\text{m}$  にわたって同心円状に温度勾配を形成することができ(1~2°C/ $\mu\text{m}$ )、中心温度は沸点にまで達することができる。またレーザーを切ると、10ms 以内に環境の温度に降下する。つまり、タンパク質の機能を生理的温度をはるかに超えて熱励起することが出来る。

## 4-3) 材料と方法

### 4-3-1) タンパク質

キネシンは小嶋らの方法を用い(Kojima *et al.*, 1997)、牛脳から精製した。チューブリンは Hyman らの手法に従って(Hyman *et al.*, 1991)豚脳から精製し、テトラメチルローダミン(tetramethylrhodamine succinimidyl ester; C-1171, Molecular Probes, Eugene, OR)でラベルした(色素とヘテロダイマーのラベル率はほぼ 100%)。微小管は 20 $\mu\text{M}$  のローダミンラベルしたチューブリンを、80mM PIPES(pH 6.8)、1mM EGTA、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM GTP、36% glycerol の溶液で 37°C で 30 分間放置することによって重合させた。その後、10 $\mu\text{M}$  の taxol(T-1912, Sigma, St. Louis, MO)を加えることによって微小管の構造を安定化させた。

#### 4-3-2) 微小管滑り運動系と TPM のためのフローチャンバー

TPM の熱源にするために、アルミニウムをカバーガラスに蒸着した(Kato *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2000)。初めにカバーガラスを 0.1M KOH で洗い、その後 100%エタノールで洗う。洗浄したガラス表面をフォトレジスト (OFPR-800, 東京応化工業、神奈川、日本)でコートする。コートした面に多数の円形(直径 10 $\mu$ m)のパターンをのせ、紫外線を照射する。紫外線を照射された部分は変性するので、その後にガラスを現像液(NMD-3、東京応化工業)につけると照射された部分は取り除かれる。そして、その表面にアルミニウムを蒸着する。残っていたフォトレジストの上に蒸着されたアルミニウムは、剥離液によってレジストと一緒に取り除かれる。最後に蒸留水で洗う。

70 $\mu$ g/ml(多分子アッセイ)または 50ng/ml(1 分子アッセイ)のキネシン分子を含んだ溶液をフローチャンバーに流し入れ、キネシンをガラス面に吸着させるために 1 分間放置する。その後、アッセイバッファー(2mM MgCl<sub>2</sub>、80mM PIPES(pH6.8)、1mM EGTA、0.7mg/ml filtered casein (073-19、Nacalai Tesque、京都、日本))でチャンバーを 2 回洗い、それぞれ 2 分間ずつ放置して、ガラス表面をカゼインでコートし、吸着していないキネシンを取り除く。次に蛍光微小管を含んだ溶液をフローチャンバーにながし、2 分間放置することでキネシンと微小管をヌクレオチドなし状態で結合させる。最後に、1mM ATP(127531, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)と酸素除去系(4.5mg/ml グルコース、0.22mg/ml グルコースオキシダーゼ(G-2133, Sigma)、0.034mg/ml カタラーゼ(C-10, Sigma)、10mM dithiothreitol(DTT)を含んだアッセイバッファーでチャンバーを満たし、マニキュアでシールした。他の試薬は全て特級を使用した。

#### 4-3-3) 温度パルス顕微鏡法(TPM)

局所的な熱励起はカバースリップ上に蒸着したアルミニウムの薄層(直径

10 $\mu$ m)を赤外レーザービーム(1W Nd: YLF laser, 1053-1000p(=1.053  $\mu$ m; Amoco Laser, IL)で照射することによって行った。微小管の温度は、テトラメチルローダミンでラベルされた微小管の蛍光の熱消光の程度で見積もった。蛍光像は30 フレーム/s ビデオで、image intensifier に接続した CCD カメラで撮影した。加藤らの方法に従って(Kato *et al.*, 1999)、 $T^{\circ}\text{C}$  における微小管蛍光像の各ピクセルごとの蛍光強度を、基準温度である  $20^{\circ}\text{C}$  との値で割ることによって、強度の割合  $r$  を求めた(Kinosita *et al.*, 1991)。室温は  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  に保った。温度と蛍光強度の関係式を求めたところ、 $r = 1 - a(T - T_0)$  となった。ここで  $a$  と  $T_0$  はそれぞれ  $0.017^{\circ}\text{C}^{-1}$  と  $20^{\circ}\text{C}$  である(図 4-1)。

## 4-4) 実験結果

### 4-4-1) 微小管滑り速度への温度パルス効果

$35^{\circ}\text{C}$  以上でのキネシン・微小管の相互作用を調べるために、微小管滑り運動系に TPM 法を応用した。我々はキネシン濃度を2種類( $70\mu\text{g/ml}$  と  $50\text{ng/ml}$ 、後者の濃度ではキネシン 1 分子によるピボットリングがみられる)(Howard *et al.*, 1989)用いて実験を行った。TPM 法を用いれば、熱平衡状態で求められた失活温度を超えてモーター機能を熱励起することが出来る。

まず、我々は比較的長めの(約  $10\mu\text{m}$ )微小管を用いて、微小管が温度勾配にどのように影響されるのかを、キネシン密度の濃い条件で調べた。滑り運動している微小管の前部の温度が高い時は、微小管はまっすぐスムーズに進んでいく様子が観察された。しかし微小管の後部の方が温度の高い時には(図 4-2a)、いくつかのバックリングが見られた。そのバックリングはそれぞれ約  $3\mu\text{m}$  の半円周をもっていた(図 4-2b)。

次に、繰り返し温度パルスを与え、微小管滑り運動の可逆的な加速、減速の様子を観察した短い微小管を用いて短い温度パルス(2 秒ずつ、数回)を与えた時の効果を調べた(キネシン濃度は  $70\mu\text{g/ml}$ )。図 4-3a に示したように、滑り速度は温度変化の後 1/30 秒以内に变化し、可逆的な2つの定常状態に



達した:平均速度は 20, 50, 22, 50, 18, 53°C でそれぞれ 0.48, 3.65, 0.44, 2.71, 0.33, 2.24  $\mu\text{m/s}$  であった。微小管の温度はすでに示したように  $r(T)$  の式をもとに滑っている微小管の蛍光強度の平均値から見積もった(図 4-3b)。(カバースリップの温度は  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  に保ってある)。微小管の速度は繰り返し熱励起するたびに徐々に低下していった、これは失活した(モーター機能を失った)キネシン分子が微小管のスムーズな動きを妨げる内部負荷になっているためであろう。また、滑り速度からみて観察中には photo-damage は検出できなかった。このように、各温度で最初に得られた値、20°C における 0.48  $\mu\text{m/s}$  と 50°C における 3.65  $\mu\text{m/s}$  が、それぞれの温度における正しい値であると考えられる。

次に、1 分子レベル(低濃度のキネシン)での滑り運動を観察した。温度パルスを与える間に、微小管のピボッティング運動がみられたものを選んで測定した(20°C)。2 秒間レーザーパルスを与えると、微小管はその間に 7.3  $\mu\text{m}$  移動し、対応する速度は 3.68  $\mu\text{m/s}$  になった(図 4-4)。この 2 秒間の熱励起中の平均温度は約 50°C と見積もられた。ここで得られた滑り速度(3.68  $\mu\text{m/s}$ , 50°C)は、通常の *in vitro* motility assay で得られる 1 分子の脳キネシンでは最も早い速度である。微小管の長さに限りがあることと(<10  $\mu\text{m}$ )、1 回目の温度パルスで失活してしまうキネシンがあるために、同一キネシン分子には 2 回しか温度パルスを当てることはできなかったが、1 回目と 2 回目の速度には変化は見られなかった(データ示さず)。また、Howard 等に指摘されたように(Howard et al., 1989)、50°C の高温においても速度はキネシンの濃度に依存しないことがわかった(図 4-3 の 3.65  $\mu\text{m/s}$  と図 4-4 の 3.68  $\mu\text{m/s}$  を比較)。

図 4-5 は、15 ~ 50°C での 1 分子のキネシンによる微小管滑り速度と、多分子アッセイによる 40°C ~ 50°C 間の滑り速度の温度依存性をまとめたものである。15 ~ 35°C での黒丸で示されたデータは、第 3 章でまとめた 1 分子アッセイによる結果を引用した(Kawaguchi and Ishiwata, 2000b)。興味深いことに、結果は図 5a に示すように 1 つの指数関数カーブで表された。15 ~ 50°C の間に不連続な部分はなく約 50 kJ/mol の一定の活性化エネルギーを示した(図 4-5b)。

## 4-5) 考察

### 4-5-1) TPM 法を用いてのキネシン分子の熱励起

キネシンと相互作用する微小管の滑り速度は温度の上昇に伴って増加することが知られていた(Mazunder and Cross, 1998; Böhm *et al.*, 2000)。しかし、最近までこの性質は 1 分子レベルでは調べられていなかった。第 3 章では 15 ~ 35°C 間において光ピンセットを用いた 1 分子ビーズアッセイによって、1 分子キネシンの温度効果を調べた(Kawaguchi and Ishiwata, 2000b)。その結果、滑り速度はアレニウス活性化エネルギー 50 kJ/mol で増加し、ATP 加水分解活性の温度依存性に比例することが分かった。一方、発生力は上記の温度範囲においては一定で、 $7.34 \pm 0.33$  pN であった(この性質はアクトミオシン複合体においても同様であった(Kawai *et al.*, 2000))。しかし、この測定方法では 35°C より上の温度での信頼できるようなデータが得られなかった。なぜならカバーガラスを保温箱の温度と同じ温度にするのに必要な時間(1 分間)の間にキネシンが失活してしまうからである。そこでより高い温度(40°C 付近(生理学的温度))でキネシンと微小管の相互作用を調べるために、以前報告した TPM 法を応用した。TPM 法では熱励起する時間を十分に短くすることができるので、平衡状態では失活してしまう温度を超えてモーター機能を熱励起することができる。このようにして得られた滑り速度の温度依存性を図 4-4 に示す。多分子アッセイでは、温度パルスを与えるごとに徐々に滑り速度が減少した(図 4-3)が、1 分子アッセイでは速度の減少は見られなかった(図 4-4)。この 1 分子での実験によって、モーター機能の失活は徐々に機能が失われるわけではなく、all-or-none 型つまり一度に生じることが示唆された(これに関しては長時間高温で放置すると徐々に機能が失われるという報告もあり、更なる実験が必要とされる)。

温度パルス法ではなく、顕微鏡全体の温度を上げたコントロール実験では、 $2.0 \pm 0.1$  (n = 7)  $\mu\text{m/s}$  (50 °C でキネシン濃度は 70  $\mu\text{g/ml}$ ) となった(データ示さず)。この速度は、同じ条件における TPM 法を用いた場合に得られる速度

の約半分であった(図 4-3)。この場合、微小管の滑り運動は遅いながら 50 で最低 20 分以上続いた。50°C で 30 分間以上経過すると Böhm ら(Böhm *et al.*, 2000)が指摘したように、キネシン分子が微小管から離れてしまうために滑り運動はほとんど観察されなくなった。これはほとんどのキネシンまたは微小管が失活してしまったことを意味する。また、アクトミオシン系では、ガラス面に HMM 分子が吸着しているが、アクチンフィラメントはガラス面からすぐに離れてしまい、50°C では 1 分以内で完全に離れてしまった(Kato *et al.*, 1999)。キネシンはミオシンよりも高い温度に対して変性しにくい特徴をもっているらしい。

15°C ~ 50°C における滑り速度( $v$ )の温度( $T$ )依存性は単純なアレニウスの式で表わされ、 $v(T)=v_0\exp(-E_a/RT)$ となった。ここで、 $v_0$  は定数、 $E_a$  は活性化エネルギー、 $R$  は気体定数である。この温度範囲で、活性化エネルギーは 50kJ/mol であった。最近、Böhm らは(Böhm *et al.*, 2000)、微小管の滑り速度のアレニウスプロットは 27 で折れ曲がり、<27°C においては 65kJ/mol、>27°C では 9kJ/mol と報告した。彼等はこの折れ曲がりにはキネシンか微小管、もしくはその両方の構造変化のためであると結論づけている(De Cuevas *et al.*, 1992)。一方、ここで得られた結果には 27 付近に折れ曲がりは見られなかった(図 4-5)。Böhm らの実験(Böhm *et al.*, 2000)は 1 分子測定ではなくて多分子であるために、ある割合のキネシン分子が熱のためにダメージを受け、その割合が負荷となって微小管のスムーズな運動を妨げているのではないかと第 3 章で示唆したが(Kawaguchi and Ishiwata, 2000b)、本章での結果はその示唆がより広い温度範囲で適用できることが分かった。

アクトミオシン系では、加藤ら(Kato *et al.*, 1999)が 2 種類の活性化エネルギーの存在を報告している。つまり、多分子アッセイにおいて 18°C ~ 30°C 間では 100kJ/mol、30°C ~ 45°C 間では 50kJ/mol となった(Kawai *et al.*, 2000 も参照)。もしアクトミオシン系においても温度パルス法を用いてさまざまな温度における 1 分子アッセイが行えれば、おそらく一定の活性化エネルギーが得られるものと考えられる。アクトミオシン系にはさらなる研究が必要とされる。

#### 4-5-2) プロセッシブ性に対する温度効果

第 3 章で述べたように (Kawaguchi and Ishiwata, 2000b)、平均の run length は温度が 15°C から 35°C へと増加するのに伴って一様に増加した。Run length の分布を指数関数で近似 (Block et al., 1990; Vale et al., 1996) できるほどには十分な量のデータがないが、50°C 付近における平均の run length は約  $9 \pm 2 \mu\text{m}$  (図 4-4 参照) となり、20 °C における run length ( $5 \mu\text{m}$ ) の 1.8 倍になった。この run length の温度依存性は、ビーズアッセイによって得られた値よりも微小管滑り運動系で得られた値の方が大きいと言う絶対値は異なるけれども 1 分子ビーズアッセイで得られたものと同様であった (Kawaguchi and Ishiwata, 2000)。Block 等 (Block et al., 1990) が指摘したように、室温において、微小管滑り運動系における run length ( $5 \mu\text{m}$ ) (Howard et al., 1989) がビーズアッセイ ( $1.4 \mu\text{m}$ ) におけるそれよりも長いのは、微小管の拡散係数がビーズよりも小さいので、滑り運動系においてはキネシンに微小管が再結合しやすくなるためであると考えられる。

run length は微小管に沿ったキネシンの連続したステップの数に比例していると考えられる。温度が上昇すると、ATP 加水分解における rate limiting step(s) が加速され、ATP 加水分解と共役している滑り速度 (stepping rate) もまた加速される。では、20°C と 50°C とで滑り速度は 7 倍も違うのに run length は 2 倍しか変わらないのであろうか (図 4-5 参照)。run length は stepping rate と結合時間 (おそらく、単頭結合の状態における時間) を掛け合わせたもので決定される。このように、run length の温度依存性が比較的小さいのは、おそらく温度の上昇に伴って結合状態の時間が減少することが原因であると考えられる。この点で、微小管とキネシンとの各ヌクレオチド状態 (単頭結合、双頭結合両方) における結合時間の温度依存性が、今後計測されるべきである。

#### 4-6) 結論

温度パルス顕微鏡法 (TPM) を用いて、15°C ~ 50°C における 1 分子または

多分子のキネシン分子が微小管と相互作用するときの滑り速度を調べた。それに対応するアレニウスプロットには不連続な部分はなく、一定の活性化エネルギー(50kJ/mol)を示した。これは広い温度範囲において、キネシンの運動していくメカニズムが共通であるということを示している。

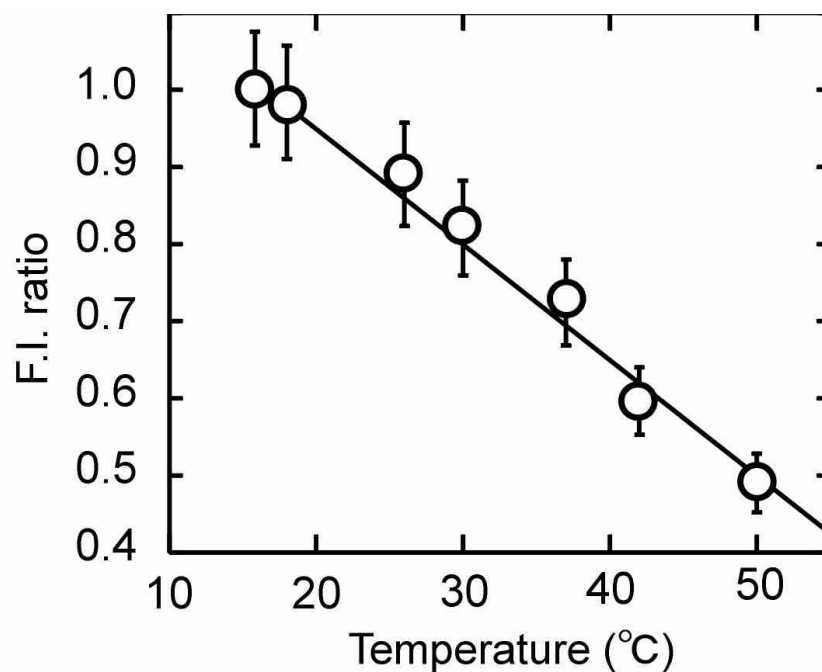
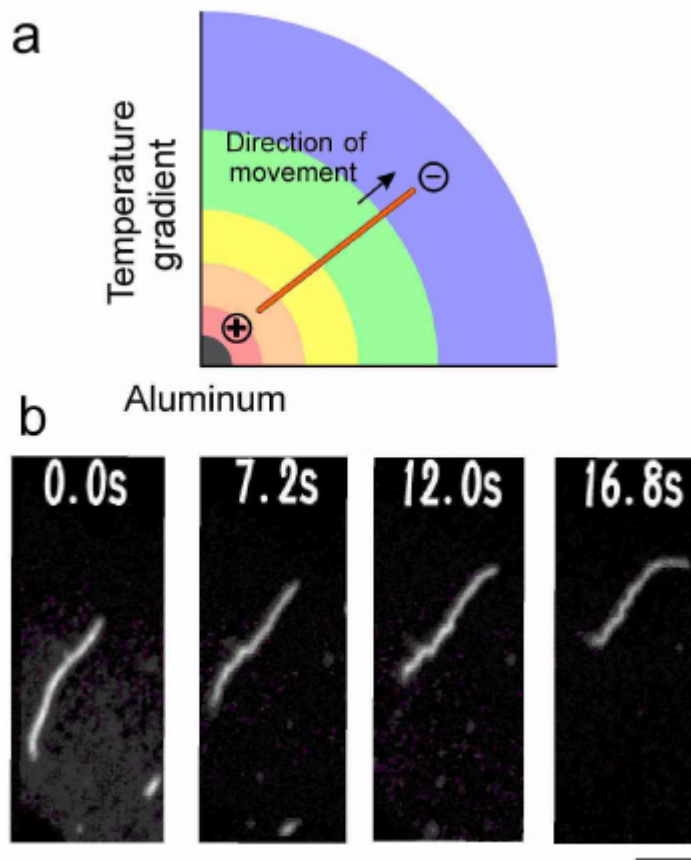


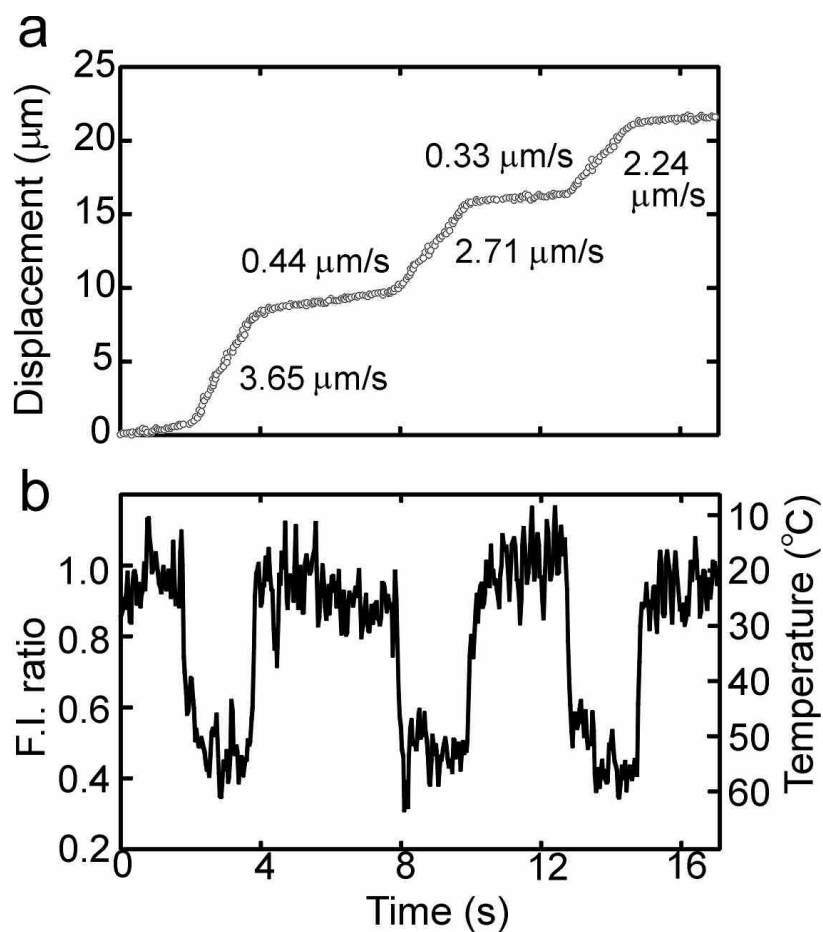
図 4-1 蛍光強度と温度の関係

加藤らの方法に従って(Kato *et al.*, 1999)、各温度での蛍光微小管像の各ピクセルごとの蛍光強度、基準温度である 20°C の強度で割ることによって、蛍光強度の比  $r$  を求めた(Kinosita *et al.*, 1991)。 $r$  の温度依存性は顕微鏡全体を覆う保温箱(insulation chamber)を用いて温度をコントロールすることによって求めた。それぞれの温度を安定させる為に 45 分かけた。室温は  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  に保った。温度と蛍光強度の関係式は  $r = 1 - a(T - T_0)$  となった。ここで、 $a$  と  $T_0$  はそれぞれ  $0.017^\circ\text{C}^{-1}$  と  $20^\circ\text{C}$  である。



**図 4-2 TPM によって形成された温度勾配下での微小管の動きのイメージ**

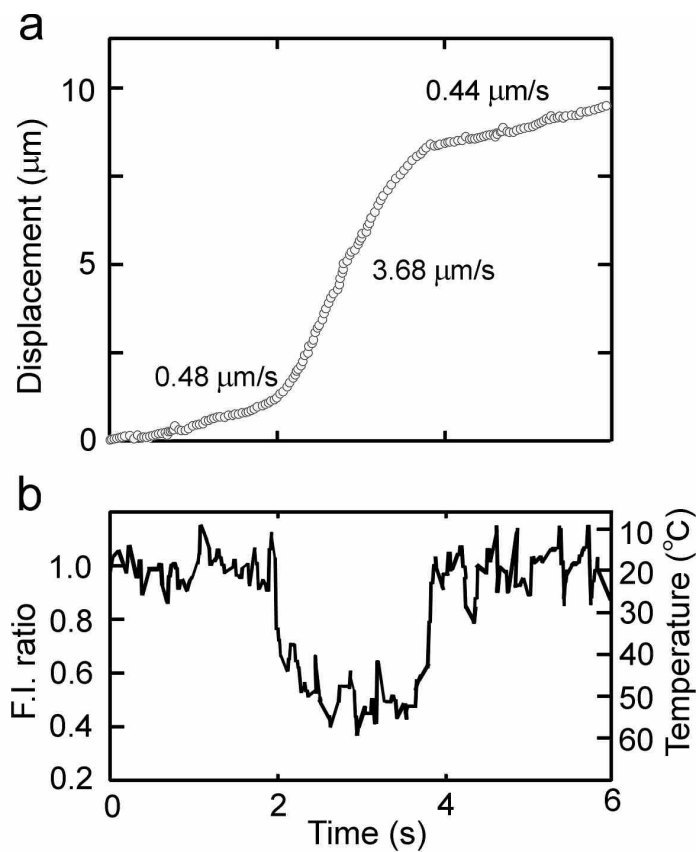
(a) TPM システムの概念図。蒸着した円形のアルミニウム(直径 10 $\mu$ m)にレーザー光を照射し、局所的な熱励起を実現した。熱源のアルミニウムを中心として図のような同心円状の温度勾配が形成される。微小管の滑り速度は温度に依存するので、温度勾配が存在する時の微小管は、一本であってもそれぞれの部分で速度が異なる。(b)長めの微小管(10 $\mu$ m)で、温度勾配の効果を調べたもの。セル中に流し込んだキネシンの濃度は 70 $\mu$ g/ml。Bar, 5 $\mu$ m



**図 4-3 温度パルスを繰り返し起したときの微小管の滑り速度の変化の様子**

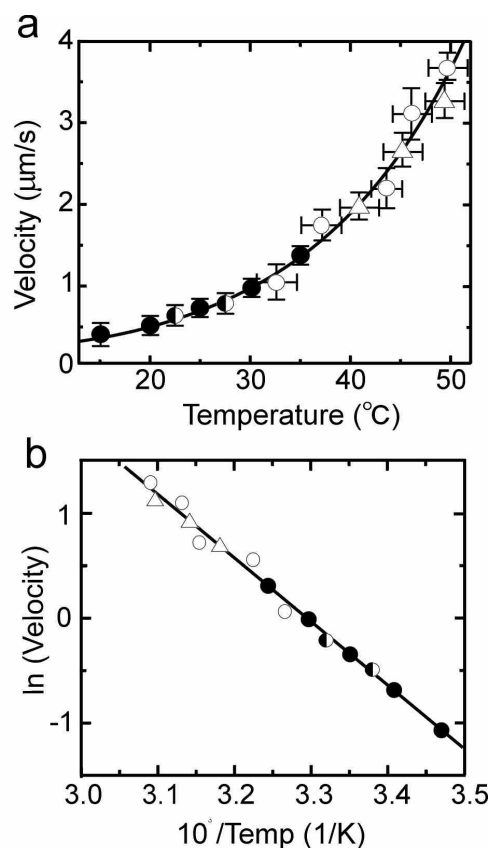
(a) 各 1/30 秒ごとの微小管(長さ  $1\mu\text{m}$ )の蛍光強度の輝度中心の位置。(b) 温度は微小管の蛍光強度の平均値(1/30 秒)から見積もった。カバーガラスの温度は  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  に保った。多分子アッセイをする為にあらかじめ  $70\mu\text{g/ml}$  のキネシンをフローチャンバーに流し込んだ。





**図 4-4 1 回の温度パルスを起こしたときの 1 分子キネシンによる微小管の滑り速度の変化の様子**

(a) 1/30 秒ごとの微小管 ( $8.4 \mu\text{m}$ ) の末端の蛍光強度の位置。(b) 温度は微小管の蛍光強度の平均値 (1/30 秒) から見積もった。カバーガラスの温度は  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に保った。1 分子アッセイをするためにあらかじめ  $50 \text{ ng/ml}$  のキネシンをフローチャンバーに流し込んだ。



**図 4-5 キネシン分子の滑り速度の温度依存性**

(a)滑り速度と温度の関係。15°C ~ 35°C (黒丸)のデータは1分子のキネシンをコートしたビーズを用いた実験の結果を用いた(Kawaguchi and Ishiwata, 2000b; 第3章)。22.5°C と 27.5°C の半分白黒のデータは保温箱を用いて得られた結果で、ピボッティングをしている微小管の速度を用いた(Kawaguchi and Ishiwata, 2000b)。32.5°C 以上のデータは本章で述べたように1分子アッセイ(白丸)と多分子アッセイ(三角)で得られたものを用いた。多分子アッセイで得られたデータは繰り返し温度パルス当てた微小管の速度の中で、1回目に得られた速度を用いた。なぜなら、温度パルスを与えるごとに速度が減少していくからである(図4-3)。エラーバーは4~6個のデータの標準偏差(SD)を表わしている。(b)図(a)のアレニウスプロット。エラーバーは省略した。

## 【第5章】

### キネシンのヌクレオチド依存単頭双頭結合

Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of  
kinesin

#### 5-1) 序文

キネシン分子モーターの運動は単頭結合、双頭結合を繰り返しながら微小管上を進んでいくと言う hand-over-hand モデルによって説明されている。ATP 加水分解中の主だったヌクレオチド状態でのキネシンの結合状態を調べるため、光ピンセットを用いて 1 分子のキネシンと微小管の複合体に外部負荷を与え、その力学的性質を調べた。AMP-PNP(ATP analog)を含んだ溶液で測定したキネシン 1 分子の弾性率と微小管との結合破断力の値は、ヌクレオチドなしの溶液、あるいは AMP-PNP + ADP の溶液で得られた値よりそれぞれ 2 倍大きくなった。これをもとに、前者の場合にはキネシンは双頭で結合しており、後者の 2 状態の場合には単頭で結合していると結論した。この結果は、hand-over-hand モデルを示唆する。

#### 5-2) 研究の背景

キネシンはニューロンを含むさまざまな細胞内に存在して微小管のプラス端方向に膜結合タンパク質やオルガネラを運ぶ分子モーターである(Vale, 1999; Hirokawa, 1998)。キネシンは微小管から解離するまでに 100 回以上の 8 nm ステップ( $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットで構成されているチューブリンヘテロダイマーのサイズ)をし(Block *et al.*, 1990; Svoboda *et al.*, 1993; Howard, 1996)、その run length は  $1\mu\text{m}$  にも及ぶ(Block *et al.*, 1990; Kawaguchi and Ishiwata, 2000)。それぞれのステップは ATP 加水分解の 1 サイクルに対応していることが分かっている(Hua *et al.*, 1997; Schinitzer and Block, 1997)。またさまざまな構造解析や生物物理学的手法によって、キネシンのステップ

は ATP を結合したキネシン頭部の構造変化によって引き起こされることが最近分かってきた(Rice *et al.*, 1999)。Hand-over-hand モデルはキネシンのプロセッシブ性を説明するために提案されたモデルである(図 5-1)(Howard, 1996; Rice *et al.*, 1999; Vale and Milligan, 2000; Mandelkow and Johnson, 1998; Hackney, 1994; Hirose *et al.*, 1999; Arnal and Wade, 1998; Thormählen *et al.*, 1998; Hoenger *et al.*, 2000)。Hand-over-hand モデルを立証するためには、キネシンの 2 つの頭部がどのヌクレオチド状態で単頭結合なのか、あるいは双頭結合なのか、またこの 2 状態間の遷移はどのように行われているのかを決定することが必要になってくる。クライオ電顕による双頭キネシンと微小管複合体の画像解析は決定的でなく、ヌクレオチドなし状態と AMP-PNP 存在下の両方で単頭結合が優位に観察されるという報告と(Hirose *et al.*, 1999; Arnal and Wade, 1998)、双頭結合が優位であるという報告(Thormählen *et al.*, 1998; Hoenger *et al.*, 2000)の両方がある。また溶液系におけるキネシン頭部とチューブリンヘテロダイマーの結合のモル比は、ヌクレオチドなし(Lockhart *et al.*, 1995; Ma and Taylor, 1997; Gilbert *et al.*, 1998)と AMP-PNP 存在下(Lockhart *et al.*, 1995)の溶液の両方で 2:1 となり、単頭結合を示唆した。しかし、これらは微小管よりも過剰なキネシン分子存在下での実験であるため、キネシンや微小管の構造に何らかの影響を与えている可能性がある(Thormählen *et al.*, 1998)。X 線結晶解析によると、微小管に結合していないキネシン頭部間の距離は約 5nm であり(Kozielski *et al.*, 1997)、チューブリンヘテロダイマーの間隔よりも短い。溶液中におけるキネシンと微小管との解離 kinetics の結果では、ヌクレオチドなしだけでなく AMP-PNP +ADP の溶液中でも単頭結合が示唆されている(Vugmeyster *et al.*, 1998)。しかし、これらの結果は全てモデルを直接検証するものではない。

### 5-3) 材料と方法

キネシンとチューブリンはそれぞれ牛脳(Kojima *et al.*, 1997)、豚脳(Hyman, 1991)から精製した。テトラメチルローダミンで蛍光標識した極性

微小管は Hyman の方法に従って準備した(Hyman, 1991)が、チューブリンの N-ethylmaleimide(NEM)処理はしなかった(図 5-2A)。キネシンビーズとフローセルの手順は以前に報告した(Kawaguchi and Ishiwata, 2000b; Kojima *et al.*, 1997)。溶液条件は  $\sim 0.1\mu\text{M}$  kinesin-coated beads、 $2\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $80\text{mM}$  Pipes (pH6.8)、 $1\text{mM}$  EGTA、 $0.7\text{mg/ml}$  filtered casein、 $10\mu\text{M}$  taxol、 $10\text{mM}$  DTT、酸素除去系であり、ヌクレオチドに関してはこの溶液に、ヌクレオチドなし状態では  $1\text{U/ml}$  apyrase、AMP-PNP + ADP 状態では  $0.5\text{ mM}$  AMP-PNP +  $1.0\text{mM}$  ADP(Vugmeyster *et al.*, 1998)、AMP-PNP 存在下では  $1\text{mM}$  AMP-PNP をそれぞれ加えた (Kawaguchi and Ishiwata, 2000b)。実験は全て  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  で行った。

光ピンセットを装備した顕微鏡システムについては第 2 章で説明した(Nishizaka *et al.*, 1995)。光ピンセットのばね定数は  $0.087\text{pN/nm}$  と見積もった。溶液中のビーズを光ピンセットで捕捉し、ガラス面に吸着している微小管の上にキネシン分子と微小管が確実に結合するように  $20 \sim 30$  秒間置く。その後捕捉中心を微小管のプラス端(またはマイナス端)方向に沿って破断が起きるまで一定速度で移動させる(図 5-2A)。捕捉中心を動かしてもしばらくの間はビーズは捕捉中心と一緒に移動する。これはキネシンが、微小管と結合していても、ビーズが回転するために、ビーズ・キネシン・微小管の回転がピンと張られるようになるまではキネシンと微小管の結合には負荷が加わらないことを意味している。キネシン付きビーズ(半径  $0.5\mu\text{m}$ ; キネシンの全長、 $60\text{nm}$ )の大きさと幾何を考慮に入れて(Svoboda *et al.*, 1994)、外部から負荷が与えられて破断現象がおきるまでに必要とされる最大の変位を  $\sim 600\text{nm}$  と見積もった。実際、破断が起きるまでの平均の変位は  $300 \pm 140\text{nm}$  ( $n=122$ )であった。また、実際のキネシンの伸びは  $8.3 \pm 1\text{nm}$  (図 5-2E) と見積もった( $18\text{nm} \times \cos(?)$ 、 $?$  はガラス面とキネシンの角度で  $1.1 \pm 0.1\text{ rad}$ )。我々の実験系では外部負荷によってキネシン・微小管複合体の伸びを見積もる時には  $\cos(?)$  をかける必要がある。

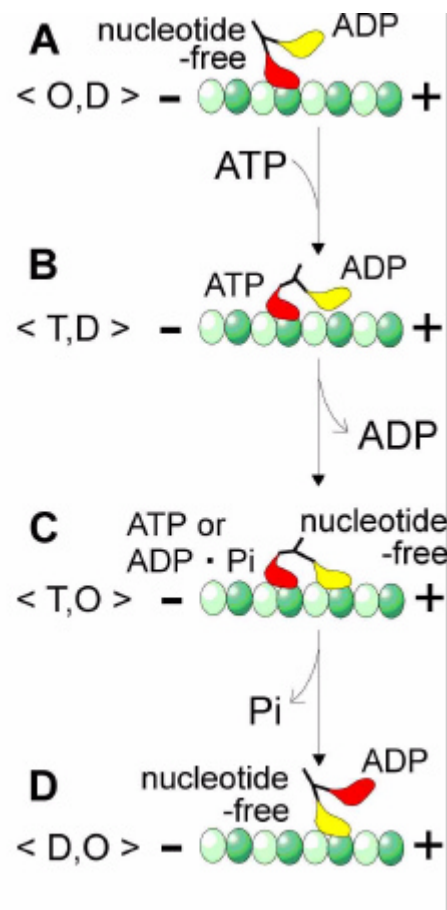
#### 5-4) 実験結果と考察

各ヌクレオチド状態における結合様式の直接的な証拠を得るために、微小管に結合している 1 分子のキネシンの力学特性を 3 種類の異なる溶液中で調べた:ヌクレオチドなし、0.5mM AMP-PNP+1mM ADP、1mM AMP-PNP である。最初の状態は図 5-1 における<O,O>、<O,D>に対応している。Apyrase を加えているが、キネシンが ADP 存在下で精製されていること、キネシンからの ADP の解離が遅いこと(Ma and Taylor, 1997; Gilbert *et al.*, 1998)から、いくらかのキネシン頭部にはまだ ADP が結合していると考えられる。2 番目の状態は<T,D>を表わしている。この条件では、二つの頭部のうち一つだけが AMP-PNP を結合していて、もう一方の頭部は ADP 状態であることが強く示唆されている(Schnapp *et al.*, 1990)。3 つめの状態は AMP-PNP とキネシン分子の結合モル比が 1:1 であることから、<T,O>状態であると考えられる(Schnapp *et al.*, 1990)。

1 分子のキネシン・微小管ビーズ複合体(図 5-2a)(Svoboda *et al.*, 1994; Kojima *et al.*, 1997) に光ピンセットを用いて外部から負荷をかけ、微小管のプラス端(マイナス端)方向それぞれに引っ張った(Nishizaka *et al.*, 1995)。我々は同一のビーズ(おそらく同一のキネシン)を用いて同じ微小管上を繰り返し破断力を測定した(図 5-2B-D)。プラス端に引っ張った時は、ヌクレオチドなしでの破断力は平均約 7pN となり(図 5-2D)、一方 AMP-PNP 存在下では明らかに 2 つの成分からなり、それぞれ約 14pN と 7pN となった。破断力が小さいほうの成分はヌクレオチドなしと一致した。同じデータを用いて、キネシン・微小管複合体の力-伸び関係を求めた(図 5-2E)。この関係はほぼ直線となり、弾性率はこの傾きから容易に求めることができた。弾性率もまた 2 つの成分に分けることができた(図 5-2E、図 5-3D-F と比較)。マイナス端に負荷をかけた場合、両方の成分ともにヌクレオチド状態に関係なく破断力は 45%増加したが、弾性率には変化がなかった。これは、プラス端に負荷をかけた方が、マイナス端よりも結合が弱くなることを表わしている。

破断力の小さい(~7pN; S-)成分と大きい(~14pN; L-)成分は弾性率も同じ様に異なっていた(図 5-3)。つまり、L-成分の破断力と弾性率は S-成分の 2 倍であった。このことから、L-成分はキネシンの双頭結合、S-成分は単頭

結合に起因すると結論された。この結論の前提には、それぞれのキネシン頭部が等しく弾性率に寄与しているという仮定がある。このことから、 $\langle O, D \rangle$ 状態における結合(図 5-1A)は単頭結合であり、 $\langle T, D \rangle$ 状態もまた単頭結合であるといえる(図 5-1B)。 $\langle T, D \rangle$ 状態において、微小管に結合している頭部はおそらく AMP-PNP(ATP) (Rice *et al.*, 1999)を結合し、解離している頭部は ADP を結合していると推測される(Rice *et al.*, 1999; Vugmeyster *et al.*, 1998)。なぜなら、ADP が結合している頭部の微小管への結合は弱いという証拠があるからである(Lockhart *et al.*, 1995; Uemura *et al.*, 2002)。それに対し、 $\langle T, O \rangle$ 状態では(図 1C)双頭結合であるといえる。これにより、我々は同一のビーズ移動速度で破断力と弾性率に 2 つの様式が存在することから(図 5-2D, 3C, 3F)、単頭、双頭結合の両方が存在すると結論した。さらに、負荷を加える方向に関係なく、負荷上昇率(*loading rate*)を 2 ~ 18pN/s に増加していくと S-成分が減少していき、最大上昇率(18pN/s)では完全に消滅した。このことは外部負荷が存在しない平衡状態では、AMP-PNP 存在下のキネシンはほぼ双頭結合であることを強く示唆する。また、プラス端方向に負荷を加えた時の方がマイナス端方向に加えた時よりも破断力が小さくなったのは、双頭結合の"bridge"構造(図 5-1C 参照)において(進行方向から見て)後ろの方の頭部が比較的不安定で、そのために外れやすい傾向にあることを意味しているのかもしれない。そのような結合状態の安定性に対する負荷の方向の非対称性が、キネシンの一方向性ステップ運動の基盤になっているのかもしれない。



**図 5-1** さまざまな実験結果をもとに提案された、**hand-over-hand モデル**

キネシンがそれぞれのヌクレオチド状態で構造変化を起こし、単頭、双頭結合を繰り返している。O:ヌクレオチドなし、D、T、Pi はそれぞれ ADP、ATP、無機リン酸である。



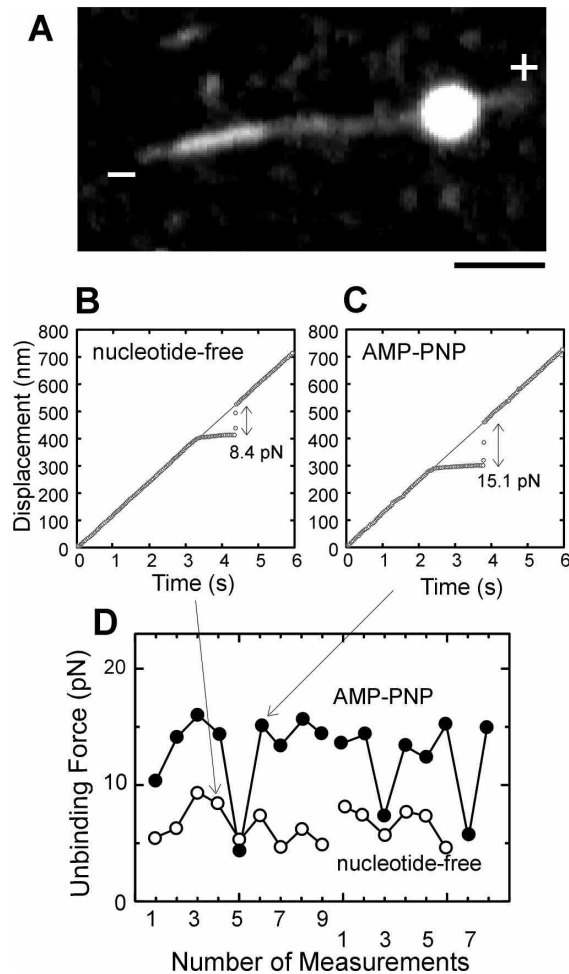
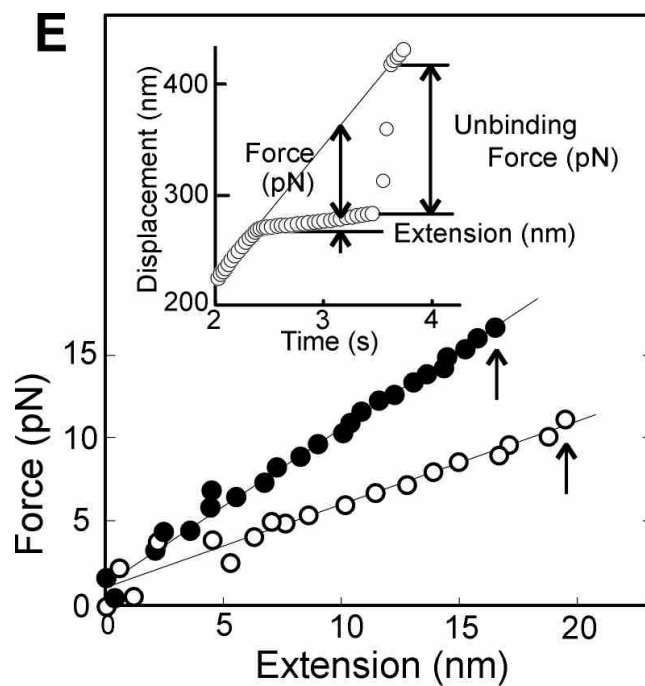
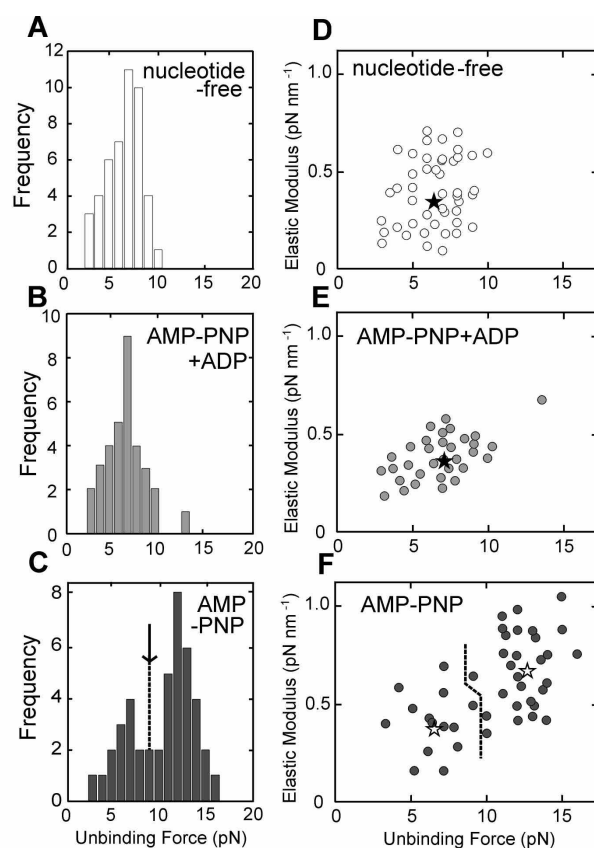


図 5-2 破断力と弾性率の 1 分子測定。

(A)キネシンをコートしたビーズが微小管に結合している様子をあらわしている蛍光像。ビーズはプラス端方向の測定の際はプラス端側に持ってきて測定した。逆の時は逆。Bar 5 $\mu$ m。(B と C)光ピンセットの捕捉中心(細線)とビーズ(丸)の輝度重心の時間変位。キネシンをコートしたビーズを、ヌクレオチドなし(B)と、AMP-PNP 存在下(C)で微小管に結合させた。その後、プラス端方向に一定速度 120nm/s (負荷上昇率は 10.4pN/s)で捕捉中心を動かした。破断力は、約 4.4s 後(B)と 3.8s 後(C)に急激な変位のあるところを破断とみなし、それぞれ 8.4pN と 15.1pN と見積もった。(D)同一キネシンで繰り返し破断力を測定した時の破断力の推移。4 つのデータを示している。矢印は(B)と(C)のデータの値を用いたことを示している。(D)での黒丸は AMP-PNP 存在下、白丸はヌクレオチドなしをそれぞれ表わしている。



(E)力と伸びの関係の例(白丸はヌクレオチドなし、黒丸はAMP-PNP 存在下)。力と伸びの関係は挿入図に示すようにビーズの変位の時間経過から求めた。厳密に言うと、力はガラス面に平行な成分のことであり、伸びはガラス面に平行にビーズがどれだけ変位したかを意味している。矢印は破断の時点を示している。



**図 5-3 異なるヌクレオチド状態における破断力(A～C)及び弾性率と破断力との関係(D～F)の様子**

外部からの負荷はプラス端方向に加えた。(A と D)ヌクレオチドなし( $n=46$ )、(B と E)AMP-PNP +ADP( $n=33$ )、(C と F) AMP-PNP( $n=43$ )。各状態での破断力 ( $\text{pN}$ ) $\pm$ SD は、それぞれ  $6.7\pm1.8$ (A)、 $7.2\pm2.0$ (B)、 $6.6\pm1.7$  ( $n=14$ ) と  $12.8\pm1.6$ ( $n=29$ )(C)。弾性率 ( $\text{pN/nm}$ )  $\pm$ SD はそれぞれ  $0.35\pm0.14$ (D)、 $0.37\pm0.16$ (E)、 $0.39\pm0.17$ ( $n=14$ )と  $0.67\pm0.21$  ( $n=29$ )(F)。負荷上昇率( $\text{pN/s}$ )はそれぞれ  $3.5$ (A と D)、 $6.0$ (B と E)、 $4.3$ (C と F)。(A)と(B)においては、一つのガウス分布でヒストグラムを simulate できたが、(C)のデータは2つのガウス分布の和であることがわかった。つまり、S-成分と L-成分がそれぞれ小さい破断力のピーク、大きい破断力のピークに対応する。S-成分と L-成分の境界は2つのガウス分布の交差部分とした(Cで矢印で示している)。(F)における境界は(C)にしたがって決定した。(D)から(F)にかけて、S-成分と L-成分の平均値を星印で示している。

## 【第 6 章】

### 1 分子力学による キネシンの単頭・双頭結合間の平衡と転移

Equilibrium and transition between single- and double-headed binding of kinesin as revealed by single-molecule mechanics

#### 6-1) 序文

前章で、キネシン・微小管複合体の破断力と弾性率の分布がヌクレオチド状態によって1つのピークをもつものと2つのピークをもつものの2種類に分類されること、そして、小さな破断力を示すピークは単頭結合に、大きな破断力を示すピークは双頭結合に対応することを示唆した。本章では、AMP-PNP 存在下のみでなく、ヌクレオチドなし状態においても破断力分布が負荷上昇率と負荷を加える方向に依存することを示す。また、ヌクレオチド状態に関係なく、微小管のマイナス端側に負荷を加えた時の破断力はプラス端側に加えたときと比べて 45%大きい値となった。これらの結果は、単頭結合と双頭結合の間に平衡関係が存在し、それぞれの結合寿命( $\tau$ )の負荷( $F$ )依存性が $\tau(F) = \tau(0)\exp(-Fd/k_B T)$  ( $\tau(0)$ は無負荷状態での結合寿命、 $d$ は相互作用の特性距離であり、ともに単頭結合か双頭結合かで値が異なる。 $k_B$ はボルツマン定数で $T$ は絶対温度)で表されるモデルに基づいて説明することができた。そのモデル解析から、単頭・双頭結合間の転移速度、 $k_+$ (単? 双)と $k_-$ (双? 単)、はそれぞれ 2、0.2/s(AMP-PNP 存在下)、70、0.7/s(ヌクレオチドなし)と見積もることができた。さらに、AMP-PNP 存在下においては、弾性率の測定中に急激に約 2 倍に増加する、つまり単頭結合から双頭結合に転移する瞬間を検出することができ、平均の転移速度を 1/s と見積もった。この結果はモデル計算で得られた値と矛盾しない。

#### 6-2) 研究の背景

キネシンは小胞やオルガネラを微小管のプラス端方向に運ぶことができ

る、プロセッシブ性をもった分子モーターである。つまり、様々な細胞体の中心から、その末梢領域に物質を運ぶ (Vale, 1999; Hirokawa, 1998)。キネシンが微小管に結合すると、それから解離するまでに連続的に 100 回以上ステップし、それぞれのステップの間隔は 8nm である。これは微小管の構成要素であるチューブリンヘテロダイマーの間隔と等しい。(Block *et al.*, 1990; Svoboda *et al.*, 1993; Howard, 1996; Vale *et al.*, 1996)。また 8nm ステップは 1 回の ATP 加水分解を伴う (Hua *et al.*, 1997; Schnitzer and Block, 1997; Mandelkow and Johnson, 1998; Coy *et al.*, 1999)。In vitro motility assay によって求められたキネシン 1 分子の平均移動距離(run length)は約 1  $\mu\text{m}$  であり、この距離はイオン強度(Block *et al.*, 1990; Vale *et al.*, 1996)や温度に依存して変化する (Kawaguchi and Ishiwata, 2000 & 2001b)。キネシンの高いプロセッシブ性は、ATP を加水分解しながらキネシンの 2 つの頭部が微小管に単頭結合、双頭結合を繰り返しながら進んでいくという hand-over-hand モデルによって説明されている (Hackney, 1994; Cross, 1995; Rice *et al.*, 1999; Vale and Milligan, 2000)。

様々なヌクレオチド状態でのキネシンの微小管への結合状態を調べるため、我々は光ピンセット(Nishizaka *et al.*, 1995)を用いて破断力と弾性率を測定し、その力学的な性質を調べた(Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)。その方法としては、2 つの頭部を持った従来型のキネシン(Conventional kinesin)を牛脳から精製し、直径 1  $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズとモル比 1:1 で結合させる。そしてそのビーズを光ピンセットにより捕捉し、カバーガラス上に吸着させた微小管の上に持っていくことでキネシンと微小管を相互作用(結合)させ(Svoboda and Block, 1994; Higuchi *et al.*, 1997; Kojima *et al.*, 1997)、次に微小管が吸着しているカバーガラスのステージを移動させたり、光ピンセットの捕捉中心を移動させることによって、微小管と平行にプラス端方向、マイナス端方向へ外部から負荷を与える。

第 5 章で述べたように(Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)、キネシンはヌクレオチドなし状態 (nucleotide-free state : 厳密に言えば、ヌクレオチドを加えない状態) と、ADP と AMP-PNP 共存下では主に単頭結合で微小管に結合し、AMP-PNP 存在下(AMP-PNP 状態)では双頭で結合していることを

発見した。この結果は、一般的に提唱されている hand-over-hand モデルを支持した。ここでは、平均の破断力と、破断力分布における単頭結合と双頭結合の比率が、負荷を加える方向と負荷上昇率に依存することを述べる。また、AMP-PNP 存在下において負荷をかけているときに弾性率が急激に約 2 倍に上昇することから、単頭結合から双頭結合への転移の瞬間を検出することができ、単頭から双頭への転移速度は約 1/s と見積もった。また、単頭と双頭間に平衡が存在し(2 つの結合状態間の転移速度を仮定した)、微小管からの解離は単頭結合と双頭結合それぞれで起こるモデルを用いてすべてのデータを説明することができ、これらの結果から我々は AMP-PNP 存在下だけでなくヌクレオチドなし状態においても外部負荷のない状態では平衡状態では双頭結合が優位であることを発見した。

第 5 章でまとめた結果では、ヌクレオチドなし状態において双頭結合に相当するような大きい破断力は検出されなかったが(Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)、これは使用した負荷上昇率がヌクレオチドなし状態での単頭・双頭結合間の転移速度定数(AMP-PNP 存在下よりも 10 倍ほど大きい)よりも非常に低かったためであると考えられる。一般的に、負荷上昇率が小さくなればなるほど、単頭で破断する確率が増加するのである。

## 6-3) 材料と方法

### 6-3-1) タンパク質

前章と同様、キネシンとチューブリンはそれぞれ牛脳(Kojima *et al.*, 1997)と豚脳(Hyman, 1991)から精製した。テトラメチルローダミン (Molecular Probes)で蛍光標識した極性微小管は Hyman (1991)の方法により調製したが、チューブリンは N-ethylmaleimide(NEM)処理は行わなかった。これにより、微小管はマイナス端へもわずかに重合した。(図 5-2A 参照:Kawaguchi and Ishiwata, 2001a).

### 6-3-2) ビーズアッセイ

キネシンつきビーズは、使用した蛍光ビーズの種類(半径 1.0 $\mu$ m, carboxylate-modified; Molecular Probes)以外は小嶋らの方法に従った(Kojima *et al.*, 1997)。また、統計的手法により1つのビーズに結合しているキネシンの平均数は1となるようにキネシンの濃度を調節した(キネシンとビーズのモル比は1~2:1)(Svoboda and Block, 1994)。極性微小管を含んだアッセイバッファー(2 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM PIPES-KOH, pH 6.8, and 1 mM EGTA)をフローセルに流し、微小管をガラス表面に吸着させるために2分間待つ。その後、0.7 mg/ml のカゼインを含むアッセイバッファーでフローセル内の溶液を交換し、カゼインでガラス表面をコートする。そしてキネシンをコートしたビーズ、カゼイン、酸素除去系を含んだアッセイバッファーで満たし、マニキュアでシールする。最終的な溶液条件は、約 0.1 pM kinesin-coated beads, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM PIPES-KOH, pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.7 mg/ml filtered casein, 10  $\mu$ M taxol, 10 mM dithiothreitol (DTT), 4.5 mg/ml glucose, 0.22 mg/ml glucose oxidase, 0.036 mg/ml catalase とし、この溶液にヌクレオチドなし状態では1 U/ml apyrase、AMP-PNP 存在下では1mM AMP-PNP をそれぞれ加えた。ヌクレオチドなし状態でのキネシンは、微小管がないと不安定であることが報告されているので(Crevel *et al.*, 1996)、アピラーゼ(ATP やADP を分解する)は測定を開始する直前に加えた。また同一のビーズで繰り返し破断力を測定することができ、その破断力や結合の性質がアピラーゼのあるなしに関係ないことを確認した。しかし、アピラーゼを入れて約 30 分経過するとキネシンは微小管に結合しなくなった。これはアピラーゼに長時間懸濁していたからであると考えられる。そのため、全てのデータはアピラーゼを混入してから10分以内に行った実験で得られたもののみを使用した。また、キネシンの活性を調べるために、ATP 存在下において *in vitro motility assay* を行い、キネシンが極性微小管のプラス端方向へ進んでいくのも確認した。破断力測定において外部からの負荷のかけ方としては、カバーガラスを固定して光ピンセットの捕捉中心を移動させる方法とカバーガラスを移動させる方法(図6-2で最速の負荷速度のみ)の2種類の方法を用いた。結合、破断のサイクルを測定できたビーズの割合は全ての実験の約 40%であり、我々が使用した光ピンセットのばね定数がかかる

ことのできる最大の負荷(約 20pN)でさえ破断が起きなかったものは約 5%であった。残りのビーズは(約 60%)結合するかどうか 3 回試しても(図 1 のステップ(1)から(2))結合しなかった。全ての実験は  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  の温度で行った。

### 6-3-3) 装置系

光ピンセットを装備した顕微鏡システムは 2 章で述べたが (Nishizaka *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 2000)、キネシン・微小管の相互作用の力学特性の研究用に改良した(Kawaguchi and Ishiwata, 2000 & 2001a)。光ピンセットのばね定数は 0.087pN/nm と見積もった(Nishizaka *et al.*, 1995)。

### 6-3-4) モデル解析

キネシンの結合、解離状態間または単頭・双頭結合間に平衡が存在すると仮定したモデル解析を行うために、*Mathematica for Windows* を用いて結合したキネシン分子の割合の時間依存性  $N(t)$  を計算した。

## 6-4) 実験結果

### 6-4-1) キネシン・微小管複合体の破断力測定

図 6-1 のスキーム図に示したように、初めに溶液中のキネシンつきビーズを光ピンセットで捕捉し(1)、微小管と 20 ~ 30 秒間相互作用させる((1)から(2))。これにより無負荷状態でのキネシンと微小管の間に結合解離の平衡関係を確立させる(2)。その後、微小管のプラス端またはマイナス端方向に捕捉中心を一定の速度で移動させる((2) から(3))。ビーズを捕捉中心に沿ってしばらく移動させると、キネシン・微小管複合体に負荷がかかり始めるためにビーズが捕捉中心からずれてくる((3)：負荷の方向はビーズ内の小さい矢印で示している)。

外部負荷をかけ続けると、キネシンと微小管の間で破断が起きる((3)から



(1')) (これを 1 回目破断:initial unbinding と呼ぶ)。1 回目破断が起きた後に捕捉中心を移動し続けると((3)から(1'))、再結合が起こり ((1') から (3))、しばしば 2 回目以降の破断が起きた((3) から (1'))。(これを 2 回目以降破断:subsequent unbinding ) と呼ぶ。第 5 章で述べたように(Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)、この実験においても、同一のビーズ、従っておそらく同一のキネシン分子で、同じ微小管上での破断力測定を繰り返し行うことができた。

図 6-2a や 6-3a で見られるように、ビーズの動きの最初の部分では、おそらくキネシンは微小管と結合しているが、ビーズが回転するためにビーズ・キネシン・微小管のつながりがピンと張るまではビーズは捕捉中心からずれない。キネシンやビーズのサイズ(ビーズの半径は 0.5  $\mu\text{m}$ ; kinesin の長さは, 60 nm)と幾何学的配置を考慮して、1 回目破断において負荷が加わるまでのビーズの最大の変位は 600nm であると見積もることができる(Svoboda and Block, 1994)。この実験において、平均の変位は約 300nm であった。上記のことを考慮に入れて、1 回目の破断が 600nm 以上のビーズ変位で起こったときは 2 回目以降の破断であるとみなした(AMP-PNP 存在下で測定したビーズの約 10%が該当。ヌクレオチドなし状態では 600nm 以上での破断は観察されなかった)。

#### 6-4-2) ヌクレオチドなし状態における破断力分布

破断力測定は様々な負荷上昇率で行った(図 6-2 と 6-3)。負荷上昇率は実験ごとに異なるために、ビーズの移動速度とタンパク質・ビーズ複合体の伸びの平均の速さの差から負荷上昇率を求めたことを述べておく。まず、ヌクレオチドなし状態において、ビーズの移動速度が 20 ~ 130nm/s では、一度破断が起きた後(図 6-2a)、数秒にわたってそのまま微小管上を移動させてもそれ以上再結合や破断のプロセス(図 6-1 における(1')と(3)の間)は観察されなかった。しかし破断力測定は同一のビーズで数回繰り返し行うことができたので(Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)、これはキネシンが失活していたと

ということではなく、ヌクレオチドなし状態では(再)結合の速度定数が小さいか、あるいは何らかの理由で動きながらの結合頻度が小さいからであると考えられる。図 6-2b にヌクレオチドなし状態における破断力分布の負荷上昇率依存をあらわしたヒストグラムをまとめたものを示す。負荷速度が 3.5 から 9.5pN に増加すると、破断力分布は 1 つのピークを持ったまま、平均破断力が 6.7 から 7.7pN(プラス端方向)、あるいは 9.5 から 11.1pN(マイナス端方向)というように、それぞれ約 15%ほど増加した。さらに負荷上昇率を約 17 から 60pN/s に増加すると、破断力分布は 2 つのピークを持つようになり、2 番目のピークの平均破断力は 1 番目のピークのほぼ 2 倍になった。ここで小さい破断力群を総称して S-成分(Component)と呼び、後のほうの大きい破断力群を L-成分(Component)と呼ぶ。また、ピークが 1 つであるか 2 つであるかに関係なく、マイナス端方向への平均破断力は全てのビーズ移動速度においてプラス端方向のそれよりも 45%大きかった。これらの結果を再現するためにモデルに基づいた破断力分布のシミュレーションを行い、その結果を図 6-2b における実線で示した(詳細は考察を参照)。

#### 6-4-3) AMP-PNP 存在下における破断力分布

AMP-PNP 存在下では、微小管に沿ってビーズを移動し続けると、1 回目破断のあとに続いて 1~3 回ほど再結合・破断のサイクルが起こった(図 6-3a)。2 回目以降破断のおこる頻度は、微小管 1 $\mu$ m あたり数回であった。2 回目以降破断において、キネシンが微小管に再結合するまでに平均 2~3 秒かかった。これは 1 回目破断と同様に、破断した後にビーズが回転ブラウン運動を行うためであると考えられる。

図 6-3b と 6-3c の左の列にはプラス端、マイナス端それぞれの方向に負荷

を加えたときの 1 回目破断の破断力分布の負荷上昇率依存性を示した。破断力分布は 2 つのピークを持つ。ここで特筆すべきは、負荷上昇率の増加とともに S-成分の割合が減少したことである。実験を行った最速の負荷上昇率(18.0pN/s)では S-成分は消滅し、L-成分のみが残った。このことは、ヌクレオチドなしでも同様であったが、AMP-PNP 存在下のほうがより低い負荷上昇率で起こった。また、ヌクレオチドなし状態では、(図 6-2b)負荷上昇率を増加していくと、負荷の方向に関係なく S-成分と L-成分両方ともに平均破断力の値が増加した。また、先程と同様にすべての負荷上昇率において、マイナス端方向に負荷を加えたときの平均の破断力はプラス端のそれよりも約 45%大きかった。

1 回目破断とは対照的に、2 回目以降破断の破断力分布はより複雑な性質を示した(図 6-3b と 6-3c の一番右の列)。負荷上昇率が増加すると、L-成分の割合は一旦増加し徐々に消滅していった。この特徴は図 6-3d(最速の負荷上昇率)で顕著に見られ、1 回目破断は L-成分だけが残るのに対して、2 回目以降破断は S-成分だけが残った。しかし、約 6pN/s より小さい負荷上昇率では、これら 2 種類の方法で得られた破断力分布は区別がつかなくなった。また興味深いことに、2 回目以降破断において(負荷の方向に関係なく)、S-成分の平均の破断力は負荷上昇率を 2.4 から 9.8pN/s に増加させると 10 ~ 40%増加し、さらに 9.8 から 18.2 pN/s に増加していくと 20 から 30%減少した。これらの特徴は 6-5)節の考察でモデルを導入して説明する。図 6-3b と 6-3c にシミュレーションで得られた曲線を重ねているが、データとかなりの差がある(定量的に異なる)ものについては破線で示した(詳細は考察を参照)。

#### 6-4-4) キネシン・微小管複合体の弾性率

次にキネシン・微小管複合体の弾性率を見積もり、破断力との関係を調べた。図 6-4 はヌクレオチドなし状態でプラス端方向に負荷を加えたときの力？ 伸び関係の一例である。F-actin と HMM(Heavy Meromyosin)の場合と異なり(Nishizaka *et al.*, 1995 の図 2b)、約 40%のデータが図 6-4a に見られるような線形(直線)を示し、残り 60%のデータは測定点がばらついたが、全てのデータは最小 2 乗法により直線で近似した。弾性率はこの直線の傾きから見積もることができ、負荷速度に依らず 3.5、6.5、9.5 pN/s でそれぞれ  $0.35 \pm 0.14$  ( $n = 46$ )、 $0.34 \pm 0.18$  ( $n = 62$ )、 $0.40 \pm 0.18$  ( $n = 31$ ) pN/nm となった(図 6-4b)。マイナス端方向に負荷を加えたときの弾性率は 3.5、6.5、9.5 pN/s でそれぞれ  $0.38 \pm 0.15$  ( $n = 34$ )、 $0.41 \pm 0.17$  ( $n = 56$ )、 $0.37 \pm 0.19$  ( $n = 36$ ) pN/nm となった。このように、弾性率は負荷上昇率だけでなく負荷の方向にも依存しなかった。

ヌクレオチドなし状態とは対照的に、AMP-PNP 存在下における力？ 伸び関係は複雑な性質を示した。力？ 伸び関係はその破断が 1 回目破断であるか 2 回目以降破断であるかによって異なる特徴を示した。すなわち、1 回目破断では S-成分(データ示さず)や L-成分(図 6-5a 参照)に関係なく常に線形で、S-成分における弾性率はヌクレオチドなし状態で得られた弾性率とほぼ等しくなった(図 6-4a 参照)。つまり、S-成分と L-成分の弾性率は負荷上昇率 1.8 pN/s のとき、プラス端方向に負荷を加えたときはそれぞれ  $0.36 \pm 0.15$  ( $n = 23$ )と  $0.77 \pm 0.29$  ( $n = 30$ ) pN/nm となり、マイナス端のときはそれぞれ  $0.33 \pm 0.18$  ( $n = 19$ )と  $0.81 \pm 0.21$  ( $n = 21$ ) pN/nm となった。ヌクレオチドなし状態と同様に、弾性率は負荷上昇率と負荷の方向には依存しなかった。

一方で、2 回目以降破断における S-成分のデータの力？ 伸び関係は全て

線形であった(1つの相からなる。データ示さず)。この関係から求められた弾性率は負荷上昇率が 5.6pN/s のとき、プラス端方向で  $0.39 \pm 0.17$  ( $n = 14$ ) pN/nm、マイナス端方向で  $0.42 \pm 0.11$  ( $n = 25$ ) pN/nm となった。L-成分においては、力？ 伸び関係の 25%が途中で折れ曲がり(図 6-5b に例示したように 2 つの相からなる)、残りの 75%の半分が直線を示し、残り半分は“ まばら ”でどちらかに区別しにくいものであったが、全てのデータを上述したように最小二乗法で直線に近似した。直線データと“ まばら ”データのそれぞれの値は、負荷上昇率が 5.6 pN/s のときに、プラス端方向で  $0.71 \pm 0.15$  ( $n = 8$ ) と  $0.65 \pm 0.12$  ( $n = 11$ ) pN/nm となり、マイナス端方向で  $0.68 \pm 0.15$  ( $n = 9$ ) と  $0.62 \pm 0.18$  ( $n = 25$ ) pN/nm となった。

2 相を示したデータに関しては、後のほうの傾き(図 6-5b における例で示した 0.95pN/nm)は 1 回目破断における L-成分の傾き(図 6-5a に示した 0.92pN/nm)と同じになった(図 6-5b 参照)。2 相のうちの前の方の傾き(図 6-5a における例で示した 0.48pN/nm)は S-成分に等しかった(図 6-5b と 6-5c)。2 相になっているものの前半と後半の傾きから求めた弾性率の平均値は、負荷上昇率が 5.6 pN/s のときプラス端方向でそれぞれ  $0.33 \pm 0.14$  と  $0.69 \pm 0.10$  ( $n = 10$ ) pN/nm、マイナス端方向でそれぞれ  $0.31 \pm 0.12$  と  $0.64 \pm 0.15$  ( $n = 6$ ) pN/nm となった。これらの場合も、弾性率は負荷上昇率と負荷の方向の両方に依存しなかった(データ示さず)。

最後に、2 回目以降破断における力？ 伸び関係が 2 相を示したものについて、最初の傾きから次の傾きへと転移がおきるまでの時間を決定した。データ数が少ないため( $n=30$ )、分布の形を決定することはできなかったが、転移までの時間は 0 から 1.6s の間で分布し、平均の時間は負荷上昇率や負荷の方向によらず約 1s だった。正確には、プラス端方向で  $1.11 \pm 0.23$  s ( $n = 20$ )、マイナス端方向で  $1.18 \pm 0.17$  s ( $n = 10$ )であった。

## 6-5) 考察

### 6-5-1) キネシンの単頭、双頭結合

破断力と弾性率の値が互いに2倍異なる2つのグループ (図 6-3b と c, 図 6-5b と c) と (図 6-2b と 6-4b) に分類できることから、キネシンには単頭結合と双頭結合の2つの結合様式が存在することが示唆された (Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)。この結論に対する強い証拠は、遺伝子操作によって得られた単頭キネシンを用いた実験によって得られた。単頭キネシンの場合には、破断力分布は全てのヌクレオチド状態でも (AMP-PNP 存在下でも) 1 つのピークをもち、平均の破断力は双頭構造の従来型キネシンにおける S-成分の値と一致した (Uemura *et al.*, 2002)。

上記のことは、AFM を用いて求められた2組のストレプトアビジン・ビオチン複合体の破断力が一組のものの2倍であったこととよく似ている (Wong *et al.*, 1998)。我々が示した負荷上昇率の増加に伴って平均の破断力が増加することも (図 6-2b と図 6-3b と c)、AFM を用いたストレプトアビジン・ビオチン複合体における実験の結果と一致する。このように、この性質はタンパク質間の相互作用に共通のものであるといえる (Merkel *et al.*, 1999)。

### 6-5-2) ヌクレオチドなし状態、AMP-PNP 存在下におけるキネシンの結合様式

図 6-3 で見られるように、1 回目破断で最速の 18pN/s では (図 6-3b と 6-3c

の左の列の下)L-成分がほとんどを占めるという事実は、AMP-PNP 存在下で外部負荷がない場合においては、平衡状態で双頭結合が優位であることを表している。もし破断実験に使用する負荷上昇率が平衡状態ある単頭・双頭結合の速度定数よりも十分に大きかったら、破断力の分布は平衡における結合状態を反映すると考えられる。この解釈は、後で述べるモデル解析によって確かめた(図 6-6)。

さらに、ヌクレオチドなし状態においても負荷上昇率の増加に伴って L-成分が出現することが分かった(図 6-2b)。しかし、S-成分から L-成分への破断力分布の転移は、AMP-PNP 存在下において数 pN/s よりも非常に大きい負荷上昇率(50pN/s 以上)で起こった。この興味深い性質についてもモデル解析で説明する(図 6-6)。

一方で、AMP-PNP 存在下での 2 回目以降破断における最も大きい負荷上昇率では S-成分が優位であったことから(図 6-3b と c の右の列の一番下)、負荷上昇率が大きすぎると単頭から双頭への転移ができず、キネシンの 2 番目の頭部が結合する前に破断するものと推測される。この推論も同様のモデル解析によって確かめることができた。モデル解析における 1 回目破断と 2 回目以降破断の唯一の違いは初期条件の違いのみである。モデル解析では、1 回目破断での単頭と双頭の結合の割合を 1:10 とし、2 回目以降破断では 1:0 とした。

AMP-PNP 存在下では、図 6-3d に示したように、5.6pN/s より低い負荷上昇率では 1 回目破断と 2 回目以降破断とで双頭結合の負荷上昇率依存性が同じになった。これはおそらく 5.6pN/s よりも低い負荷上昇率においては、負荷がかかっている時も単頭結合・双頭結合間の平衡状態が保たれており、破断力分布は初期条件に依存しなくなるからであると考えられる。また双頭結合の割合は、負荷上昇率をさらに低くしていくと顕著に小さくなっていく

た(図 6-3d)。これは負荷上昇率が低いほど単頭結合での破断の確率が高くなるということで理解できる。

図 6-3d にまとめた結果は単頭、双頭結合間の転移の速度定数  $k_+$  と  $k$  の関係を含んでいると考えられる(図 6-1 参照)。つまり、AMP-PNP 存在下では、2 回目以降破断の途中で、単頭結合から双頭結合へと転移するということを仮定して、単頭結合の平均の破断力の大きさが 7pN であること、7.0pN/s の負荷上昇率において双頭結合の割合が 50%になること(図 6-3d の矢印)を考慮して  $k_+$  は  $1/s (= (7.0 \text{ pN/s})/(7 \text{ pN}))$  と見積もることができる。この解釈は、負荷が加わっている瞬間に弾性率が変化するという結果が得られたことによって直接的に確認された(図 6-5a)。転移がおこるまでの時間は約 1s と見積もられたので、これは上記の  $k_+$  と一致する。

破断力分布の負荷上昇率依存性は、主に  $k_+$  で決定されるが、負荷を加える方向に依存しないことは非常に興味深い。この性質は ATP の存在下でプラス端方向への負荷(Coppin *et al.*, 1997)や微小管に垂直に負荷をかける(Gittes *et al.*, 1996)ことによって、キネシンの歩く速度が増加すること、つまり ATP 存在下で  $k_+$  は負荷を加える方向に依存するという結果とは対象的である。上記の性質はヌクレオチドなし状態や AMP-PNP 存在下といった平衡状態に固有の性質であるかもしれない。

2 回目以降破断における最も早い負荷上昇率では平均の破断力が急激に減少したが(図 6-3b と 3c の最も右下)、以下で述べたモデルではこの結果を説明できなかった(特にピーク位置がモデル解析で得られたものと大きくずれている)。これはおそらく一つの頭部の中に弱結合と強結合をする 2 つの微小管結合部位が存在することを示唆している (Woehlke *et al.*, 1997; Hirose *et al.*, 1995; Crevel *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 2002)。つまり 2 回目以降破断においては最初に単頭の弱結合が起こり、負荷上昇率が高いと弱結



合から強結合への転移が生じる前に単頭で解離してしまうからであると考えられる。この解釈は、結合部位の近くに compliant な部分はおそらく存在せず、平均の破断力が減少しても弾性率は変化しない(図 6-5c)という事実とは矛盾しない。いずれにしても、これは従来型の双頭キネシンの代わりに単頭のキネシンを使うことによって実験的に確かめられるべきである (Uemura *et al.*, 2002)。

### 6-5-3) モデル解析

次に、上記の結果を説明するために図 6-6 に示したようにモデル解析を行った。特に 1)ヌクレオチドなし状態(図 6-2b)だけでなく、2)AMP-PNP 存在下(図 6-3b と c)での 1 回目破断と 2 回目以降破断における平均の破断力の負荷上昇率依存性や、破断力の負荷方向について検討した。

まず、図 6-6a に示したスキームに従ってキネシンの結合状態の数  $N(t, F)$  の時間( $t$ )と外部負荷( $F$ ) の依存性を解析した。単頭キネシンを用いた場合は (Uemura *et al.*, 2002)、破断は一つのステップで起こると仮定し(図 6-6a における(1)状態のみ)、 $N(t, F)$ は  $t$ だけの関数( $F$ は  $F = \alpha t$ で表されるから: $\alpha$ は定数)とした。このように、 $N(t)$ は  $N(t) = N(0)\exp(-t/\tau(F))$ で表され、 $N(0)$ は時刻が 0 のときの attached state の割合であり、 $\tau(F)$  は  $F$  に依存する結合の寿命である。つまりここでも $\tau$ はまた  $t$ だけの関数となる。ここで、アクトミオシン actin-myosin(HMM and S1)の rigor 結合の結果に従って(Nishizaka *et al.*, 2000)、 $\tau(F) = \tau(0)\exp(-Fd/k_B T) = \tau(0)\exp(-\alpha d/k_B T)t = \tau(t)$ 、ここで $\tau(0)$ は外部負荷がないときの結合寿命で 150s(Hancock and Howard, 1999; Uemura *et al.*, 2002)、 $d$ は特性距離、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は絶対温度を仮定した。このモデルは破断力が負荷上昇率の増加に伴って増加していく性

質を再現するだけでなく、 $d$  の値をプラス端方向への負荷の場合に 4.0nm、マイナス端負荷で 3.0nm(Uemura *et al.*, 2002 を参照)であると仮定することによって、マイナス端方向へ負荷を加えたときの破断力がプラス端負荷よりも 45% 大きいという事実もシミュレートすることができた。

対照的に、従来型の双頭構造のキネシンの場合、結果はそう単純ではない。本章での結果を説明するために(図 6-3 と 図 6-5; また Kawaguchi and Ishiwata, 2001a の図 2 を参照)、図 6-6a に示すように単頭結合と双頭結合の間に平衡関係が存在することを仮定した。また我々は単頭、双頭結合状態でのキネシンの微小管からの解離は異なる $\tau(0)$ と  $d$  の値をもつと仮定した(Strunz *et al.*, 2000)。このように、 $N_1(t)$  と  $N_2(t)$ はそれぞれ単頭結合と双頭結合の数(規格化すると、それらの割合)であり、次の微分方程式に従う：

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = k - N_2(t) - \left\{ k_+ + \frac{1}{t_1(t)} \right\} N_1(t) \quad (1)$$

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = k + N_1(t) - \left\{ k_- + \frac{1}{t_2(t)} \right\} N_2(t) \quad (2)$$

ここで、 $t=0$  では  $N_1 + N_2 = 1$  である。上記の微分方程式(式 1 と 2)を解くと、破断力分布  $P(F(t))$ は、次の数式で得られる(式 3)。

$$P(F(t)) = -\frac{d(N_1(t) + N_2(t))}{dt} = \frac{N_1(t)}{t_1(t)} + \frac{N_2(t)}{t_2(t)} \quad (3)$$

ここで、破断力分布のヒストグラムは  $P(t)dt$  (または  $P(F)dF$ )で得られる。つまり、 $t$  と  $t+dt$ の間(または  $F$  と  $F+dF$ の間)で破断の起きる確率である。

また、双頭結合からの直接の破断が存在することを仮定した。なぜならこの仮定がなければ、破断力の分布はかなり広くなるからである(Strunz *et al.*, 2000)。今双頭結合があったとすると、片方の頭部が外れると残りの頭部に瞬時に 2 倍の負荷が加わると考えられる。すると、直ちに結合していた頭部も解離してしまうだろう。つまり、微小管から 2 つの頭部が同時に解離

するのと同等であるとみなせる。実際、双頭結合状態の後で一方の頭部が解離し、単頭結合になったことを示す事例は観察されなかった(図 6-2a、6-3a、6-4a におけるビーズの変位の時間変化の結果を参照)。双頭結合から単頭結合への転移の瞬間を検出するためには、ビデオレート以上のより高い時間分解能が必要とされる。

モデル解析によって、破断力が負荷方向と負荷上昇率に依存するのを再現するために、 $\tau_1(0)$ と $\tau_2(0)$ の値をそれぞれ 150s と 2000s、そして  $d_1$  と  $d_2$  の値をそれぞれプラス端方向(+)で 4.0 と 3.0nm、マイナス端方向(-)で 3.0 と 2.5 nm とした(表 6-1 参照：Uemura *et al.*, 2002)。双頭結合の寿命は $\tau_2(0)$ であらわされるが、モデル解析で実際に用いた値は(図 6-6a の(2))、 $\tau_1(0)$  を 150 s に固定し、すでに報告されている無負荷における双頭のキネシン・微小管複合体の平均の結合寿命である 1000s(Hancock and Howard, 1999)を満たすように決定した(Uemura *et al.*, 2002)。平均の結合寿命は 1000s であるが、 $k_+$ と $k_-$ の比が 10 に保たれている限り、 $k_+$ と $k_-$ の絶対値には依存しなかった。1 回目破断において、 $\tau_1(0)$ と  $\tau_2(0)$ の比を約 1:10 に選んだとき、 $N_1(0)$ と  $N_2(0)$ はそれぞれ 1/11 と 10/11 になった(つまり、 $k_+/k_-=10$ )。ここで、1 回目破断は単頭結合 双頭結合間の平衡が保たれている状態で起こると仮定する。一方、2 回目以降破断は常に単頭結合から始まると仮定しているので、2 回目以降破断の  $N_1(0)$ と  $N_2(0)$ はそれぞれ 1 と 0 を選択した。これはコンピューター解析の結果から最もよく  $k_+$ と  $k_-$ を再現するのは、AMP-PNP 存在下ではそれぞれ 2.0 と 0.2 /s、ヌクレオチドなし状態では 70 と 7 /s (比はあくまでも 10 に保っている)であったためである(図 6-6b に例を示した)。

このように、上記のモデル解析により破断力分布の重要な性質を再現することができた(図 6-2b、図 6-3b と c における実線を参照)。しかし、図 6-6b

の三角印の曲線と図 6-3d を比較して分かるように、この単純なモデルでは 2 回目以降破断における 5pN/s より高いところでの  $N_2$  の急激な減少は再現できなかった(図 6-6b と図 6-3d を比較。図 6-3b と 6-c の破線も参照)。この高い負荷上昇率での 2 回目以降破断でみられた大きなずれは、 $k_+$  または  $k_-$  が負荷上昇率に大きく依存すると仮定することで改善される。例えば、図 6-6b に示したように、もし 5pN/s において 2 と 0.2 /s であった速度定数が 7.5 pN/s では 0.5 と 0.05 /s のように低くなるとすると、図 6-3d に見られるような大きい負荷上昇率依存性を説明することができる。

1 回目破断においては、速度定数  $k_+$  と  $k_-$  の負荷(負荷上昇率)依存性を考慮に入れる必要はなかった。しかし、これは速度定数が 1 回目破断においては外部負荷に対して感受性がないと言っているのではなく、このモデルに関しては負荷依存の速度定数の導入による改善はみられなかったということである。また、ヌクレオチドなし状態における破断力分布は 1 回目破断だけで得られている。そして分布の形は速度定数の負荷依存性を考慮に入れても入れなくてもほとんど変わらなかった。

このように、単純なモデルにもとづいてキネシン・微小管結合の 1 回目、2 回目以降破断の数(正規化したときの割合)が再現された。表 6-1 に実験データを一番よく再現するパラメーターのまとめを示した。このようにして得られた破断力分布は実験結果の特徴をよく再現した(ヌクレオチドなし状態では図 6-2b に示した実線、AMP-PNP 存在下では図 6-3b-d を参照)。ここで、さらに強調しておくが、モデル解析における 1 回目、2 回目以降破断の違いは初期条件の違いのみである(図 6-6 参照)。他のパラメーターの値を変える必要はなかった。

ヌクレオチドなし状態と AMP-PNP 存在下との間での 1 回目破断における顕著な違いは、破断力分布が 2 つのピークから 1 つのピークへと転移す

る負荷上昇率が、ヌクレオチドなし状態(図 6-2b)の方が AMP-PNP 存在下(図 6-3b-d)よりも大きかったということである。我々のモデルによれば、この違いは、単頭結合と双頭結合の間の転移の速度定数の違いによっている(前者では 70 と 7 /s、後者では 2 と 0.2 /s。つまり、前者の方が一桁速い)(表 6-1 参照)。

#### 6-5-4) 力学的な性質、負荷方向の非対称性とその生理学的意義

負荷方向に破断力が依存することの単純な説明としては(図 6-2 と図 6-3)、おそらく外部負荷の作用点の非対称性によるものであると考えられる。従って、外部負荷は非対称にキネシン・微小管結合表面にかかるといえる(図 6-1 におけるキネシン分子のイラスト参照; Rice *et al.*, 1999; Hoenger *et al.*, 2000)。

我々のモデル解析によると、破断力の非対称性はプラス端方向への負荷のほうがマイナス端方向よりも大きくなる特性距離  $d$  の違いに起因している。これは、破断を引き起こすのに必要な負荷はプラス端方向の負荷より小さく、これは上記の解釈と一致する。

プラス端への破断力が小さいことは、キネシンがプラス端方向に進んで行きやすいことを示している。双頭結合になると 2 つの頭部は"Bridge"構造になる。もし前方の頭部が後方の頭部を引っ張ると、またその逆もあるが、後方の頭部はプラス端に引っ張られることになるのでもし両方のヌクレオチド状態が同じであれば比較的に不安定であるということがいえる(Uemura *et al.*, 2002)。さらに、もし後方の頭部が前方に引っ張られるために不安定化することがヌクレオチドの結合、解離と連動していたとすると、つまり、もしそのような分子内のメカノケミカルカップリングでおこるシンクロが

おこるのなら、単頭と双頭結合を繰り返すことでキネシンが直線的に進むのを可能にしていると考えられる。

#### 6-5-5) キネシン・微小管複合体の寿命と破断力の関係

キネシン・微小管複合体の寿命は、結合エネルギーと関係するのであるが、双頭結合のキネシンではヌクレオチドなし状態と AMP-PNP 存在下の両方において無負荷状態で 1000 s であり、単頭のキネシンでは 100s であった (Hancock and Howard, 1999)。今回の実験においては、10pN の負荷がかかっているときに寿命の平均は約 1s と見積もられた。これはアクトミオシン複合体におけるライゴール結合のように、結合の寿命 ( $\tau$ ) と外部負荷 ( $F$ ) の関係を  $\tau(F) = \tau(0) \exp(-Fd/k_B T)$  であらわすことができると仮定した (Nishizaka *et al.*, 1995, 2000)。今回のモデル解析ではデータを再現するもっともふさわしい  $d$  の値はプラス端方向で 3.0-4.0nm であり、マイナス端方向で 2.5-3.0 nm であった。AMP-PNP 存在下における結合寿命の負荷依存性について調べた以前の実験においても、今回の結果に矛盾しない (Seo and Ishiwata, 未発表データ)。この値は普通のタンパク質・タンパク質相互作用における値よりも一桁大きい値である (Nishizaka *et al.*, 2000)。このような大きい特性距離はおそらく分子モーターに固有のものであると考える。

#### 6-5-6) キネシン・微小管複合体の伸びについて

破断が起きるときのキネシン分子の伸びについては、溶液条件に関係なく破断力と弾性率の比よりプラス端方向で約 18nm (マイナス端方向で 21 nm) であるを見積もられた。しかし、この見積もりは見かけの大きさである。ビ

ースの半径を  $0.5\mu\text{m}$ 、キネシンの長さが  $60\pm 20\text{nm}$  (Svoboda and Block, 1994)であることを考慮すると、 $18\text{nm}$  ( $21\text{nm}$ )の見かけの伸びに対応するキネシンの伸びは  $8.3 \pm 1$  ( $9.7 \pm 1$ )  $\text{nm}$  と見積もることができる。これは約  $18$  (or  $21$ )  $\text{nm} \times \cos(q)$  で求めたものであり、 $q$  ( $1.1\pm 0.1\text{rad}$ )はカバーガラスとキネシンの長軸の間の角度である (Kawaguchi and Ishiwata, 2001a)。しかし、 $8.3$  (または  $9.7$ )  $\text{nm}$  の値は依然としてキネシンのような小さいタンパク質の伸びの値としては大きい。このような大きい伸びはおそらくそれぞれのキネシン頭部における伸びと部分的な unfolding、例えばネックリンカー部分の un-zipper などだけでなく (Rice *et al.*, 1999)、チューブリンヘテロダイマーの結合領域の伸びも原因の一つと考えられる

結論として、今回の研究によって破断力と弾性率を測定することで様々なヌクレオチド存在下におけるキネシンの微小管への結合様式を決定することができた。

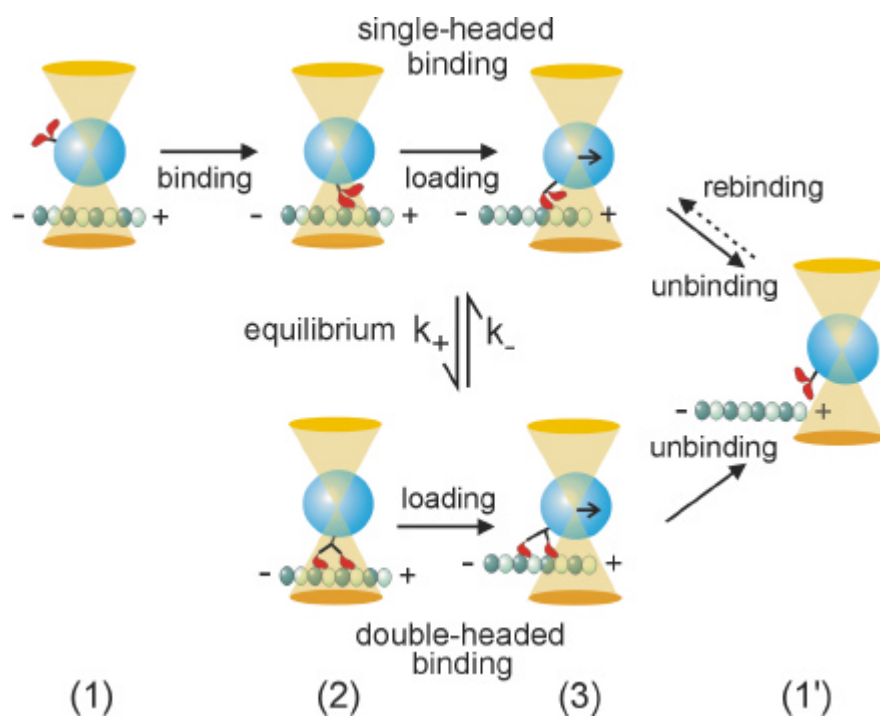
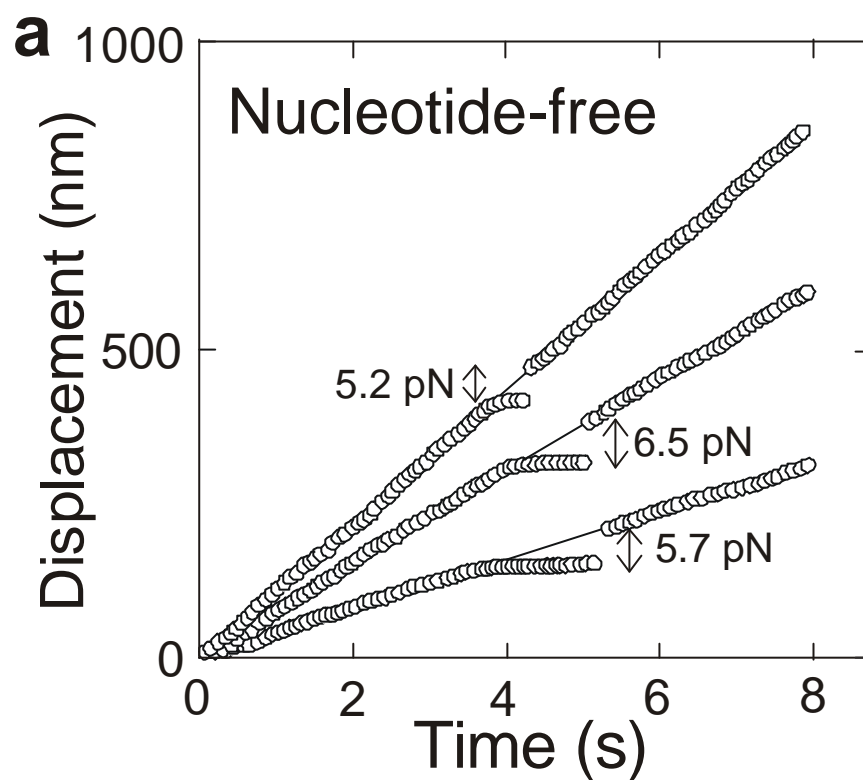


図 6-1 キネシンの微小管への結合状態と測定手順を示した模式図

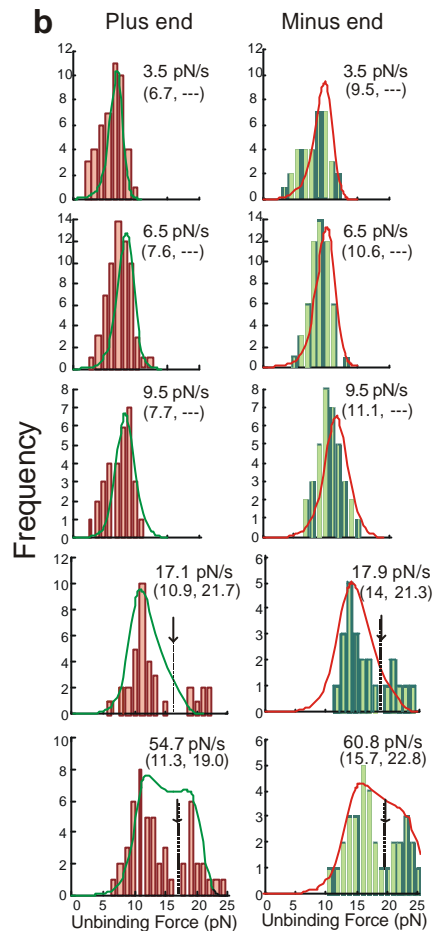
単頭と双頭結合の間に、速度定数がそれぞれ  $k_+$  と  $k_-$  の平衡が存在することを仮定した(詳細は本文参照)。



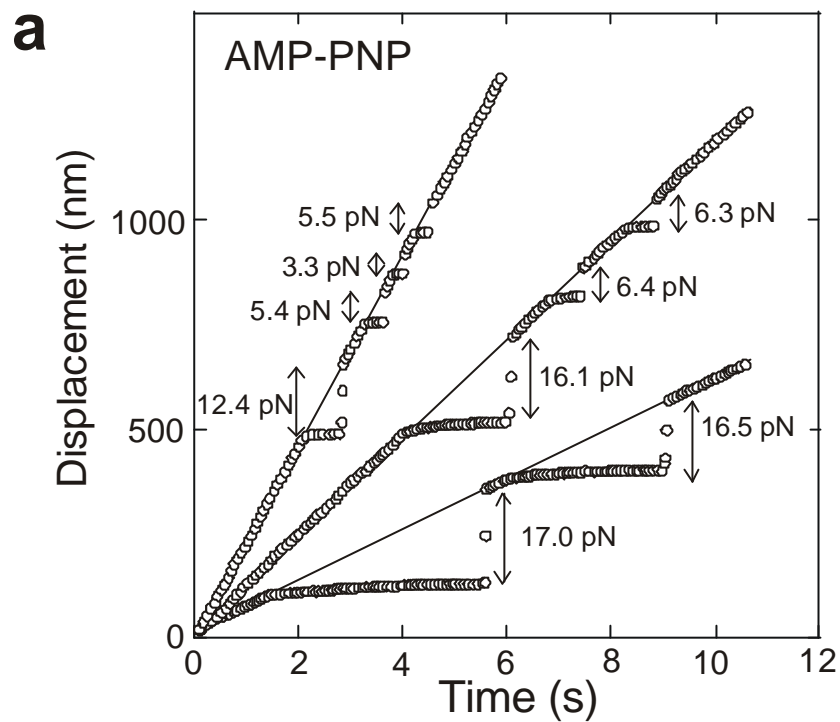


**図 6-2** ヌクレオチドなし状態における、破断力分布の負荷上昇率依存性

破断力はプラス端方向(a と b の左の列)、またはマイナス端方向(b の右の列)に負荷を加えることによって測定した。a, 様々な移動速度での(下から 110、75、40 nm/s)、光ピンセットの捕捉中心(細い実線)とビーズ(円)の動きの例。

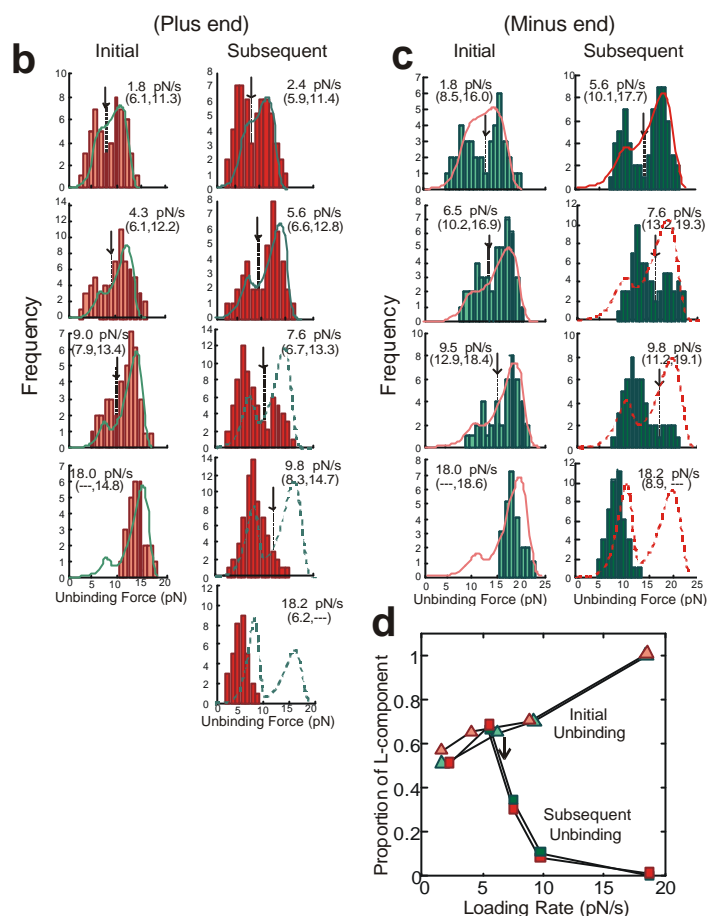


**b**, プラス端方向(ピンク)とマイナス端方向(黄緑色)それぞれに様々な負荷上昇率(pN/s)を加えたときの破断力分布。50pN/s よりも大きい負荷を加えたときは、ビーズの捕捉中心を動かすかわりにビーズの捕捉中心を固定してカバーガラスを移動した。負荷上昇率は単純にビーズの移動速度から求めた場合(一番速い場合のみ)と、ビーズの移動速度とキネシン・微小管複合体の平均の伸び速度(図 6-4a の挿入図参照)の間の違いから決定した場合とがある。つまりもしビーズの移動速度が同じだったとしても負荷上昇率は伸び速度にも依存するので毎回実験ごとに異なることになる。矢印で示した破線は、S 成分と L 成分の境界線を表わしているが、これは目測で決めた。S 成分と L 成分の平均の破断力(pN)をカッコ内に示す。破断力分布のシミュレーションカーブについては( プラス端への負荷は緑、マイナス端方向への負荷の結果は赤で ) 考察と図 6-6 におけるモデル解析を参照。

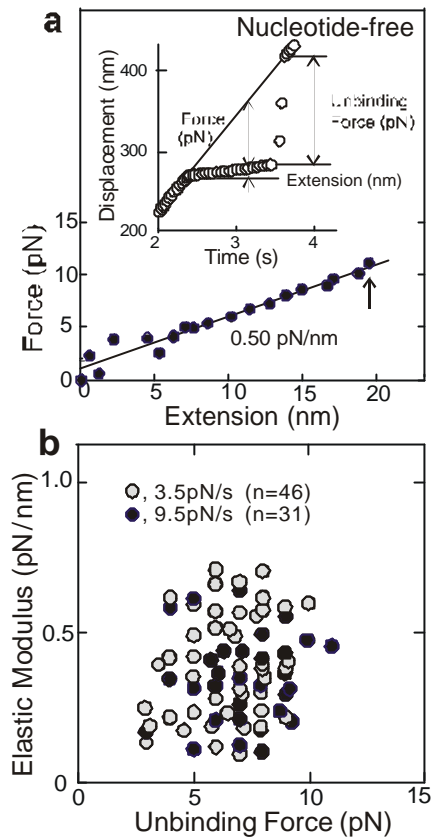


**図 6-3 AMP-PNP 存在下における破断力分布の負荷上昇率依存性**

破断力はプラス端(a と b)、マイナス端(c)のいずれかに負荷を加えることで測定した。a, 様々なビーズの移動速度 (上から下にかけて 110、75 、40 nm/s)における光ピンセットの捕捉中心(細線)とビーズの輝度重心の時間変化。

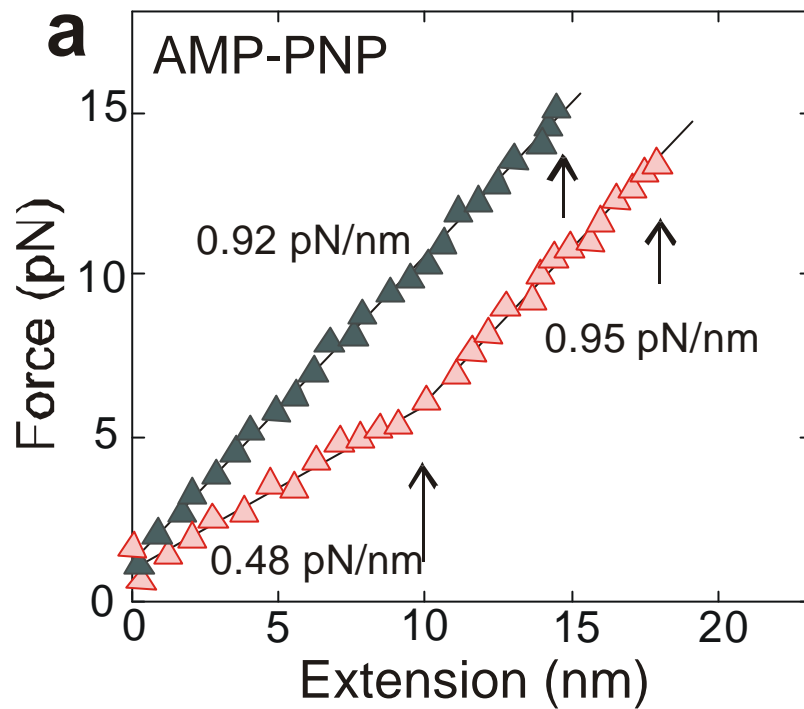


**b** と **c**, プラス端方向(赤)またはマイナス端方向(緑)に様々な負荷上昇率 (pN/s; 図 6-2 説明を参照)で負荷を加えたときの一回目破断(**b** と **c** の左の列で、明るい赤と緑でそれぞれ示している)と 2 回目以降破断(**b** と **c** の右の列で、暗い赤と緑でそれぞれ示している)の破断力分布を表すヒストグラム。矢印付きの破線は、S 成分と L 成分の境界であるが、これは目測で決めた。S 成分と L 成分の平均の破断力(pN)はカッコ内に示した。破断力分布のシミュレーションカーブ(プラス端方向は緑、マイナス端方向は赤)についての詳細はモデル解析と図 6-6 を参照。破線はシミュレーションの結果が実験データから大きく外れたことを示している。**d**, 一回目破断(三角形)と 2 回目以降破断(四角形)における L 成分の割合の負荷上昇率依存性。明るい赤、または暗い赤(明るい緑、または暗い緑)で示した印は **b** の左右の列から(または **c** の左右の列から)それぞれ得られたものである。矢印については考察を参照。



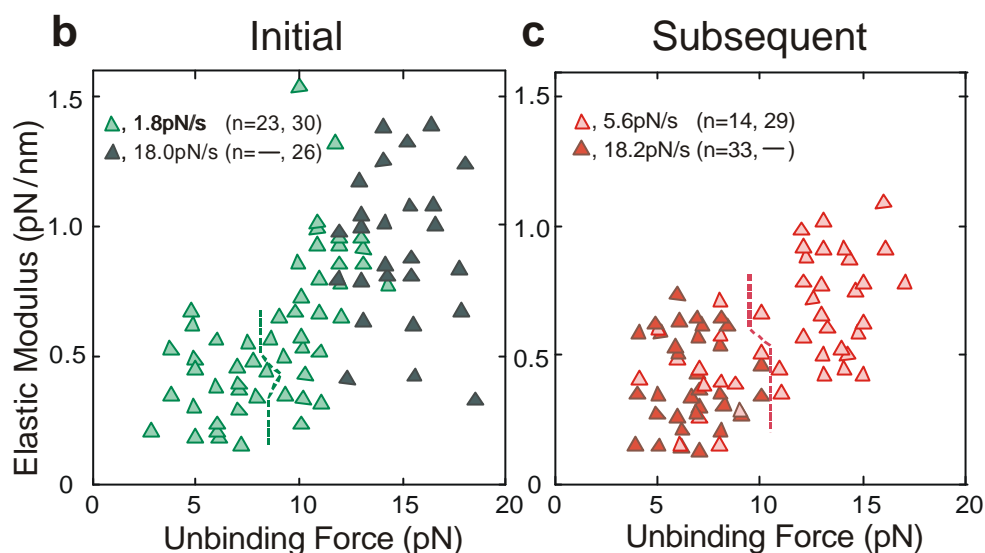
**図 6-4** ヌクレオチドなし状態における、プラス端方向に負荷を加えたときに測定された S 成分の弾性率と破断力の関係

a、力と伸びの関係はビーズの変位と時間の関係(挿入)から求められた (Kawaguchi and Ishiwata, 2001a; Nishizaka *et al.*, 1995)。その負荷上昇率は約 9pN/s(図 6-2 の説明を参照)。厳密に言えば、力はガラス表面とは平行な成分を意味し、伸びもガラス表面とは平行な面内での伸びを意味している(考察を参照)。矢印は破断が起きた瞬間を示している。弾性率は細線の傾きから見積もられた。b、図 6-2b の左の列から得られた負荷上昇率 3.5 pN/s (グレーの円形)と 9.5 pN/s (黒の円形)における弾性率と破断力の関係。平均の弾性率は(平均  $\pm$  SD, 単位は pN/nm) 3.5 pN/s において  $0.35 \pm 0.14$  ( $n = 46$ )、9.5 pN/s において  $0.40 \pm 0.18$  ( $n = 31$ )であった。

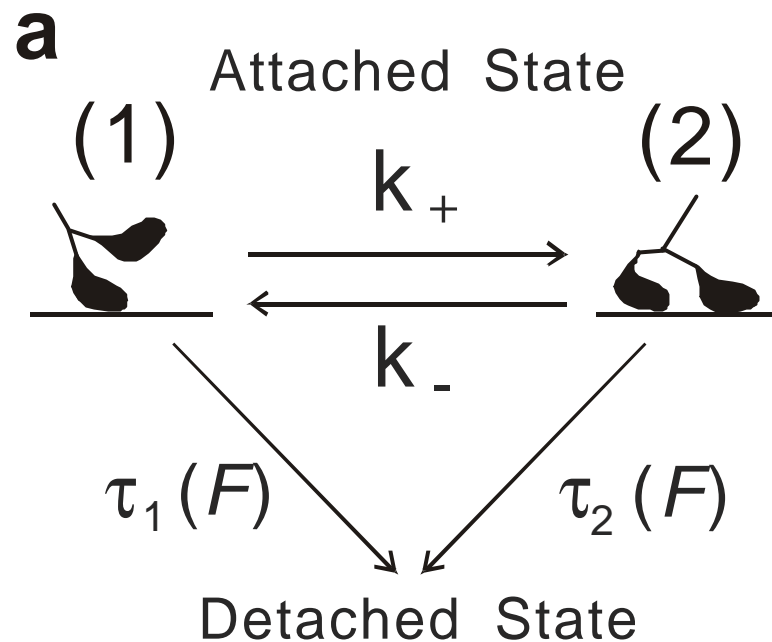


**図 6-5 AMP-PNP 存在下におけるキネシン分子の弾性率と破断力の関係**

a, 1 回目破断(深緑)と 2 回目以降破断(ピンク)それぞれのビーズの変位(図 6-4 a 参照)から求められた力と伸びの関係の例。短い矢印はキネシンの解離が起こった瞬間を示している。長い矢印は小さい傾きから大きい傾きへと遷移した瞬間を示している。深緑とピンクのデータは b と c それぞれにおけるデータに対応している。



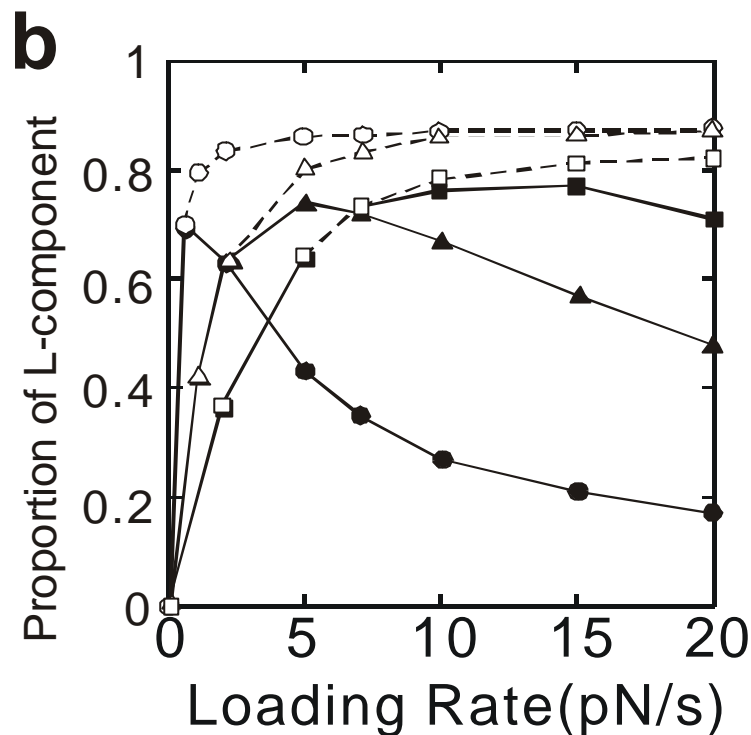
**b & c**, 1.8 pN/s (明るい緑) と 18.0 pN/s (深緑)での1回目破断(**b**、図 6-3b の左のカラム参照)と、5.6 pN/s (ピンク)と 18.2 pN/s (赤)における2回目以降破断(**c**、図 6-3b の右のカラム参照)におけるキネシン分子の弾性率と破断力の関係。力と伸びの関係が途中で一度折れ曲がったときは、折れ曲がり前後の両方の傾きを **c** にプロットした。点線で分けてある2つの領域は図 6-3b で決定した S 成分と L 成分それぞれに対応している。弾性率(平均 ± S.D、単位は pN/nm)は一回目破断における 1.8 pN/s で  $0.36 \pm 0.15$  ( $n = 23$ ) と  $0.77 \pm 0.29$  ( $n = 30$ )、18.0 pN/s では L 成分のみで (—,  $0.86 \pm 0.28$  ( $n = 26$ )) となり、2回目以降破断では 5.6 pN/s で  $0.39 \pm 0.17$  ( $n = 14$ ) と  $0.67 \pm 0.21$  ( $n = 29$ )、18.2 pN/s では S-成分のみで  $0.38 \pm 0.19$  ( $n = 33$ ) となった。



**図 6-6 破断力の平均と分布が負荷上昇率と負荷を加える方向に依存することを説明するためのスキーム**

a, まず単頭(1)と双頭(2)の結合状態の間に、速度定数が  $k_+$  と  $k_-$  の平衡が存在することを仮定する。結合寿命は、解離する率の逆数であるが、それぞれの状態での結合寿命は  $\tau_i(F) = \tau_i(0)\exp(-F \cdot d_i/k_B T)$  ( $i = 1, 2$ ) と表わせる。ここで  $d_i$  は特性距離、 $k_B$  はボルツマン定数  $T$  は絶対温度(Nishizaka et al., 2000)である。このモデル計算において、 $\tau_i(0)$  の値は実験で得られた値をもとに決定し(Hancock and Howard, 1999)、それによりパラメーター  $d$ ,  $k_+$  と  $k_-$  の値を最適化した。





b, 上記のモデルに従って、図 6-3d にまとめたデータを最もよく再現する値を決定することを試みた。つまり、AMP-PNP 存在下での 1 回目破断と 2 回目以降破断の L-成分の負荷上昇率依存性である。ここで、AMP-PNP 存在下でのプラス端方向への負荷において、 $k_+$ と  $k_-$ の値を平衡定数を変えないように変更していったとき、つまり  $\tau_1(0)$ と  $\tau_2(0)$ の値をそれぞれ 150s と 2000s(比が約 10)に選んだことを考慮して、 $k_+/k_-$ の比を 10 に固定したときのモデルシミュレーションの結果を示す。白抜きと塗りつぶした印はそれぞれ 1 回目破断と 2 回目以降破断を表しているが、 $k_+$ と  $k_-$ の値は 1 回目、2 回目以降破断に依存しないと仮定した。曲線はそれぞれ、 $k_+$ と  $k_-$ (1/s)がそれぞれ 0.5 と 0.05(円形)、2 と 0.2(三角形)、5 と 0.5(四角形)の場合である。

Table1 Parameters used for model analysis

	AMP-PNP		Nucleotide-free
	Initial	Subsequent	Initial
$\tau_1(0), \tau_2(0)[s]$	150, 2000	150, 2000	150, 2000
$d_{+}(1), d_{+}(2)$ $d_{-}(1), d_{-}(2)$ [nm]	4.0, 3.0 3.0, 2.5	4.0, 3.0 3.0, 2.5	4.0, 3.0 3.0, 2.5
$N_1(0), N_2(0)$	1/11, 10/11	1, 0	1/11, 10/11
$k_{+}, k_{-}$ [1/s]	2.0, 0.2	2.0, 0.2	70, 7

表 6-1

## 【第 7 章】

### まとめ

### Conclusion

#### 7-1) 本論文のまとめ

本論文の結果は次のようにまとめられる。

- 1 . ビーズアッセイ法により、15°C から 35°C の間でのキネシン 1 分子の滑り速度については 50kJ/mol のアレニウス活性化エネルギーで増加し、平均移動距離、つまりキネシンのプロセッシブ性については、温度の上昇に伴って増加した。キネシン 1 分子の最大発生力に温度依存性は見られず、 $7.34 \pm 0.33$  pN (平均 $\pm$ 標準偏差  $n=70$ ) であった。また滑り速度の負荷依存性は、温度によらず負荷の増加とともに直線的に減少した。
- 2 . キネシンの滑り速度を、温度パルス顕微鏡法を用いて 35°C から 50°C (瞬間的には  $\sim 60^\circ\text{C}$ ) という高温で測定することに成功した。最大速度は  $3.68 \mu\text{m/s}$  に達し、今まで報告された天然キネシンの速度として最速を記録した。アレニウスプロットは 15°C から 50°C の間で一定の活性化エネルギー(約 50kJ/mol)を示した。これはキネシンの分子メカニズムが、生理的な温度を含む広い温度領域にわたって共通であることを示唆する。
- 3 . 光ピンセットを用いて 1 分子のキネシンと微小管の複合体に外部負荷を加え、その力学的性質を調べた。AMP-PNP を含んだ溶液で測定したキネシン 1 分子の弾性率と微小管との結合破断力の値は、ヌクレオチドなし、あるいは AMP-PNP +ADP 存在下で得られた値よりも 2 倍大きくなった。この結果から、前者の場合にはキネシンは双頭で結合しており、後者の 2 状態においては単頭で結合していると結論した。この結果は hand-over-hand モデルと合致した。

- 4 . 破断力分布は AMP-PNP 存在下のみでなく、ヌクレオチドなし状態においても負荷上昇率と負荷を加える方向に依存することを見出した。また、ヌクレオチド状態や負荷を加える方向に関係なく、微小管のマイナス端側に負荷を加えた時の破断力はプラス端側に加えたときと比べて 45%大きい値となった。これらの結果は単頭結合と双頭結合の間に平衡関係が存在し、それぞれの結合寿命の負荷( $F$ )依存性を $\tau(F) = \tau(0)\exp(-Fd/k_B T)$ で表わしたモデルを用いて説明することができた。そのモデル解析から、単頭結合から双頭結合との間の転移速度は、それぞれ 2、0.2/s(AMP-PNP 存在下)、70、0.7/s(ヌクレオチドなし)と見積もることができた。さらに、AMP-PNP 存在下において単頭結合から双頭結合に転移する瞬間を検出し、その転移速度を 1/s と見積もった。これはモデル計算の値と一致した。

これらの結果はどれもキネシン 1 分子の性質として新しい知見である。

## 7-2) 今後の展望

この数年の間に、分子モーターが 1 分子レベルでどのように働き、力を発生するかの具体的な描像が得られるようになった。モーターコアのヌクレオチド結合部位で始まる小さな構造変化が歩行運動へと増幅されていく。生化学、クライオ電子顕微鏡、1 分子計測の結果はすべて、微小管に結合したキネシン頭部に ATP が結合することによって構造変化が生じることを示している。この構造変化によって、解離している方の頭部が微小管に結合できるようになり、そのことが後方の結合頭部に対して微小管のプラス端方向への内部負荷を生み出す。では、内部負荷がどのようなメカニズムで、方向性運動を引き起こす分子内協調性を生み出すのだろうか？最近、一定負荷を加えるとキネシンの ATPase 活性が下がるという報告がある(Schnitzer *et al.*, 2000)。このような性質こそ、化学力学酵素としての分子モーターの本質をつくものであろう。内部負荷による分子内協調性のメカニズムを明らかにするための鍵もここにある。今後はさらに高時空間分解能で構造変化を捉える研究が盛んになるだろう。安藤らによって開発された高速 AFM によるミオ

シン V のリアルタイム 1 分子挙動観測なども注目される (Ando *et al.*, 2001)。キネシン歩行運動における構造変化の役割をさらに明確にするためには、各ヌクレオチド結合状態での結晶構造解析が必要になる。そしてまた、ステップ中の頭部の動きを直接観察することができれば、もっと詳細にキネシンの歩行運動メカニズム、つまりそこにおける化学・力学共役の内容を理解することができるだろう。その一方で、上で述べたように、必ずしもタンパク質の構造変化を必要としない Biased Brownian ラチェットモデルの方が正しいようにみえる現象がある。ラチェットモデルを肯定的にしる否定的にしる実証するためには、どのような実験を組めば良いだろうか。これこそ実験家にとって大きなチャレンジである。

## 【参考文献】

- Ando, T., N.Kodera, E.Takai, D. Maruyama, K. Saito, and A.Toda (2001). A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:12468-12472.
- Anson, M. (1992). Temperature dependence and arrhenius activation energy of F-actin velocity generated in vitro by skeletal myosin. *J. Mol. Biol.* **224**: 1029-1038.
- Astumian, R.D. (2001). Making molecules into motors. *Sci. Am.* **285**, 56-64
- Block, S.M., L.S.B. Goldstein, and B.J. Schnapp (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348**: 348-352.
- Böhm, K.J., R. Stracke, M. Baum, M. Zieren, and E. Unger (2000). Effect of temperature on kinesin-driven microtubule gliding and kinesin ATPase activity. *FEBS Lett.* **466**: 59-62.
- Brady, S.T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* **317**: 73-75.
- Coppin, C.M., D.W. Pierce, L. Hsu, and R.D. Vale (1997). The load dependence of kinesin's mechanical cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:8539-8544.
- Coy, D.L., M. Wagenbach, and J. Howard (1999). Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J. Biol. Chem.* **276**:3667-3671.
- Crevel, I.M., A. Lockhart, and R.A. Cross (1996). Weak and strong states of kinesin and ncd. *J. Mol. Biol.* **257**:66-76.
- Cross, R.A. (1995). On the hand over hand footsteps of kinesin heads. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**:91-94.
- De Cuevas, M., T. Tao, and L.S.B. Goldstein (1992). Evidence that the stalk of *Drosophila* kinesin heavy chain is an  $\alpha$ -helical coiled coil. *J. Cell Biol.* **116**: 957-965.

- Endow, S.A. and H. Higuchi (2000). A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature* **406**: 913-916.
- Gittes, F., E. Meyhöfer, S. Baek, and J. Howard (1996). Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule. *Biophys. J.* **70**:418-429.
- Goldstein, L.S. (2001). Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol.* **12**: 477-482.
- Grafstein, B., and D.S. Forman (1980). Intercellular transport in neurons. *Physiol. Rev.* **60**: 1167-1283.
- Hackney, D.D. (1988). Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 6314-6318.
- Hackney, D.D. (1994). Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:6865-6869.
- Hancock, W.O., and J. Howard (1999). Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:13147-13152.
- Harada, Y., K. Sakurada, T. Aoki, D.D. Thomas, and T. Yanagida (1990). Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. *J. Mol. Biol.* **216**: 49-68.
- Higuchi, H., E. Muto, Y. Inoue, and T. Yanagida (1997). Kinetics of force generation by single kinesin molecules activated by laser photolysis of caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 4395-4400.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and mechanism of organelle transport. *Science* **279**:519-526.
- Hirose, K., A. Lockhart, R.A. Cross, and L.A. Amos (1995). Nucleotide-dependent angular change in kinesin motor domain bound to tubulin. *Nature* **376**:277-279.
- Hirose, K., L. Lowe, M. Alonso, R.A. Cross, and L.A. Amos (1999).

- Congruent docking of dimeric kinesin and ncd into three-dimensional electron cryomicroscopy maps of microtubule-motor ADP complexes *Mol. Biol. Cell* **10**:2063-2074.
- Hoenger, A., M. Thormahlen, R. Diaz-Avalos, M. Doerhoefer, K.N. Goldie, J. Muller, and E. Mandelkow (2000). A new look at the microtubule binding patterns of dimeric kinesins. *J. Mol. Biol.* **297**:1087-1103.
- Homsher, E., F. Wang, and J.R. Sellers (1992). Factors affecting movement of F-actin filaments propelled by skeletal muscle heavy meromyosin. *Am. J. Physiol.* **262**: C714-C723.
- Howard, J., A.J. Hudspeth, and R.D. Vale (1989). Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* **342**:154-158.
- Howard, J. (1996). The movement of kinesin along microtubules. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 703-729.
- Howard, J. (2001) *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc.
- Hua, W., E.C. Young, M.L. Fleming, and J. Gelles (1997). Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature* **388**:390-393.
- Hyman, A.A. (1991). Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence. *J. Cell Sci. Suppl.* **14**: 125-127.
- Ishiwata, S., and K. Kawaguchi (2000). Nucleotide- and loading rate-dependent switching of single- to double-headed binding of kinesin. *Biophys. J.* **78**: 278A (Abstract).
- Kato, H., T. Nishizaka, T. Iga, K. Kinoshita, Jr., and S. Ishiwata (1999). Imaging of thermal activation of actomyosin motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 9602-9606.
- Kawaguchi, K., and S. Ishiwata (2000). Temperature dependence of force, velocity and processivity of single kinesin molecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **272**:895-899.
- Kawaguchi, K., and S. Ishiwata (2001a). Nucleotide-dependent single- to



- double-headed binding of kinesin. *Science* **291**:667-669.
- Kawaguchi, K., and S. Ishiwata (2001b). Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy. *Cell Motility Cytoskel.* **49**:41-47.
- Kawaguchi, K., S. Uemura, S. Ishiwata (2003). Equilibrium and transition between single- and double-headed binding of kinesin as revealed by single-molecule mechanics. *Biophys J.* **84**:1103-1113.
- 川口憲治、上村想太郎、石渡信一 (2002). キネシン分子モーターの仕組み. *生物物理* **42**:156-161.
- Kawai, M., K. Kawaguchi, M. Saito, and S. Ishiwata (2000). Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles. *Biophys J.* **78**:3112-3119.
- Kikkawa, M., E.P. Sablin, Y. Okada, H. Yajima, R.J. Fletterick, N. Hirokawa (2001). Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* **411**: 439-445.
- Kinosita, Jr., K., H. Ito, S. Ishiwata, K. Hirano, T. Nishizaka, and T. Hayakawa (1991). Dual-view microscopy with a single camera: real-time imaging of molecular orientations and calcium. *J. Cell Biol.* **115**: 67-73.
- 喜多村和郎, 岩根敦子, 徳永万喜洋 (2000). *生物物理* **40**: 89-93.
- Kojima, H., E. Muto, H. Higuchi, and T. Yanagida (1997). Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.* **73**: 2012-2022.
- Kozielski, F., S. Sack, A. Marx, M. Thormahlen, E. Schonbrunn, V. Biou, A. Thompson, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow (1997). The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell* **91**: 985-994.
- Kull, F.J., E.P. Sablin, R. Lau, R.J. Fletterick, R.D. Vale (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* **380**: 550-555

- Lasec, R.J., J.A. Garner, and S.T. Brady (1984). Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.* **101**: 2181-2193.
- Mandelkow, E., and K.A. Johnson (1998). The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *TIBS* **23**:429-433.
- Mayhöfer, E., and J. Howard (1995). The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 574-578.
- Mazümdar, M., and R.A. Cross (1998). Engineering a lever into the kinesin neck. *J. Biol. Chem.* **273**:29352-29359.
- Merkel, R., P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans (1999). Energy landscapes of receptor-ligand explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* **397**:50-53.
- Miyata, H., H. Hakoziaki, H. Yoshikawa, N. Suzuki, K. Kinoshita, Jr., T. Nishizaka, and S. Ishiwata (1994). Stepwise motion of an actin filament over a small number of heavy meromyosin molecules is revealed in an *in vitro* motility assay. *J. Biochem.* **115**: 644-647.
- Nishiyama, M., E. Muto, Y. Inoue, T. Yanagida, and H. Higuchi (2001). Substeps within the 8-nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nature Cell Biol.* **3**: 425-428
- Nishizaka, T., H. Miyata, H. Yoshikawa, S. Ishiwata, and K. Kinoshita Jr., (1995). Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers. *Nature* **377**: 251-254.
- Nishizaka, T., R. Seo, H. Tadakuma, K. Kinoshita, Jr., and S. Ishiwata (2000). Characterization of single actomyosin rigor bonds - Load-dependence of lifetime and mechanical properties -. *Biophys. J.* **79**:962-974.
- Okada, Y., and N. Hirokawa (1999). A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* **283**: 1152-1157.
- Rice, S., A. W. Lin, D. Safer, C.L. Hart, N. Naber, B.O. Carragher, S.M. Cain, E. Pechatnikova, E.M. Wilson-Kubalek, M. Whittaker, E. Pate, R.

- Cooke, E.W. Taylor, R.A. Milligan, and R.D. Vale (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402:778-784.
- Schief, W.R. and J. Howard (2001). Conformational changes during kinesin motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 19-28.
- Schnitzer, M.J., and S.M. Block. (1997). Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* 388:386-390.
- Schnitzer, M.J., K. Visscher, and S.M. Block (2000). Force production by single kinesin motors. *Nature Cell Biol.* **2**: 718-723.
- Strunz, T., K. Oroszlan, I. Schumakovitch, H. –J. Güntherodt, and M. Hegner. (2000). Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds. *Biophys. J.* 79:1206-1212.
- Svoboda, K., C.F. Schmidt, B.J. Schnapp, and S.M. Block (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365**: 721-727.
- Svoboda, K., and S.M. Block (1994). Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* **77**: 773-784.
- 徳永万喜洋 (1997) 「ナノピコスペースのイメージング - 生物分子モーターのメカニズムを見る - 」 吉岡書店 (柳田敏雄、石渡信一編)
- Uemura, S., K. Kawaguchi, J. Yajima, M. Edamatsu, Y. Y. Toyoshima, and S. Ishiwata (2002). Kinesin-microtubule binding is dependent on both nucleotide state and loading direction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:5977-5981.
- Vale, R.D., Reese, T.S, Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generation protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**:39-50.
- Vale, R.D. and F. Oosawa (1990). Protein motors and Maxwell's demons: does mechanochemical transduction involve a thermal ratchet? *Adv. Biophys.* **26**: 97-134.
- Vale, R.D., T. Funatsu, D.W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, and T.

- Yanagida (1996). Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380**: 451-453.
- Vale, R.D. (1999). Kinesin, conventional. In: Kreis TE and Vale RD, editors. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins, 2nd edn. Oxford: Oxford Univ. Press, p 398-402.
- Vale, R.D. and R.A. Milligan (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins *Science* **288**: 88-95.
- Wade, R.H. and F. Kozielski (2000). Structural links to kinesin directionality and movement. *Nature Struc. Biol.* **7**: 456-460.
- Winkelmann, D.A., L. Bourdieu, A. Ott, F. Kinose, and A. Libchaber (1995). Flexibility of myosin attachment to surfaces influences F-actin motion. *Biophys. J.* **68**: 2444-2453.
- Woehlke, G., A. K. Ruby, C.L. Hart, B. Ly, N. Hom-Booher, and R.D. Vale (1997). Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* **90**:207-216.
- Wong, S.S., E. Joselevich, A. T. Woolley, C. L. Cheung, and C. M. Lieber (1998). Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology. *Nature* **394**:52-55.
- Yasuda, K., K. Okano and S. Ishiwata (2000). Focal extraction of surface-bound DNA from a microchip using photo-thermal denaturation. *Biotechniques* **28**:1006-1011.

## 【研究業績】

論文	<p>( 1 ) ( 報文 )</p> <p>Equilibrium and transition between single- and double-headed binding of kinesin as revealed by single-molecule mechanics  <i>Biophysical Journal</i> <b>84</b>, 1103-1113 (2003)  K. Kawaguchi, S. Uemura, S. Ishiwata</p> <p>( 2 ) ( 報文 )</p> <p>キネシン分子モーターの仕組み  <i>生物物理</i> <b>42</b>, 156-161 (2002)  川口憲治、上村想太郎、石渡信一</p> <p>( 3 ) ( 報文 )</p> <p>Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction  <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> <b>99</b>, 5977-5981 (2002)  S. Uemura, K. Kawaguchi, J. Yajima, M. Edamatsu, Y. Y. Toyoshima, S. Ishiwata</p> <p>( 4 ) ( 報文 )</p> <p>Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy  <i>Cell Motility and the Cytoskeleton</i> <b>49</b>, 41-47 (2001)  K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p> <p>( 5 ) ( 報文 )</p> <p>Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin  <i>Science</i> <b>291</b>, 667-669 (2001)  K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p>
----	--

講演	<p>( 6 )            ( 報 文 )</p> <p>Temperature dependence of force, velocity and processivity of single Kinesin molecules</p> <p><i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> <b>272</b>, 895-899 (2000)</p> <p>K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p>
	<p>( 7 )            ( 報 文 )</p> <p>Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles</p> <p><i>Biophysical Journal</i>, <b>78</b>, 3112-3119 (2000)</p> <p>M. Kawai, K. Kawaguchi, M. Saito, S. Ishiwata</p>
	<p>Intra and Intermolecular synchronization observed in kinesin and myosin</p> <p>Gordon Research Conference Colby-Sawyer, USA Jun 2002</p> <p>S. Ishiwata, S. Uemura, K. Kawaguchi, Y. Shimamoto, D. Sasaki, M. Suzuki</p>
	<p>キネシン単頭内における2つの結合状態</p> <p>日本生物物理学会・第39回年会 大阪大学 2001年10月</p> <p>上村想太郎、川口憲治、矢島潤一郎、枝松正樹、豊島陽子、石渡信一</p>
	<p>Two binding states in each head of kinesin as revealed by single-molecule mechanics</p> <p>ICBP 2001 4th International Conference on Biological Physics Kyoto, Japan Jul 2001</p> <p>S. Uemura, K. Kawaguchi, J. Yajima, M. Edamatsu, Y.Y. Toyoshima, S. Ishiwata</p>
	<p>Single molecule study on binding mode of kinesin</p> <p>The Molecular Motors workshop in Alpbach Austria Mar 2001</p> <p>S. Uemura, K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p>

	<p>Microscopic and model analysis of binding mode of single kinesin molecules with microtubule</p> <p>The Fifth Hamamatsu International Symposium on Biology : Computational Biology Analysis of Molecular Machines Hamamatsu, Japan Feb 2001</p> <p>S. Uemura, K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p>
	<p>Microscopic analysis of binding mode of single kinesin molecules with microtubule</p> <p>The 11th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience =COE International Conference= Awaji, Japan Nov 2000</p> <p>S. Uemura, K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p>
	<p>キネシン・微小管結合様式の1分子顕微解析</p> <p>日本生物物理学会・第38回年会 東北大学 2000年9月</p> <p>上村想太郎、川口憲治、石渡信一</p>
	<p>Effect of temperature on force generation and velocity of single kinesin molecules</p> <p>Biophysical Society・44th Annual Meeting New Orleans, USA Feb 2000</p> <p>K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p>
	<p>Nucleotide- and loading rate-dependent switching of single- to double-headed binding of kinesin</p> <p>Biophysical Society・44th Annual Meeting New Orleans, USA Feb 2000</p> <p>S. Ishiwata, K. Kawaguchi</p>
	<p>キネシンの単頭-双頭結合変換</p> <p>日本生物物理学会・第37回年会 理化学研究所 1999年10月</p>

	<p>川口憲治、上村想太郎、石渡信一</p> <p>Single-head and double-head binding of kinesin with microtubule as revealed by unbinding force measurements</p> <p>Biophysical Society • 43rd Annual Meeting Baltimore, USA Feb 1999</p> <p>K. Kawaguchi, S. Ishiwata</p> <p>1 分子破断力解析における微小管 キネシン単頭、双頭結合の識別</p> <p>生体運動合同班会議 名古屋 1999 年 1 月</p> <p>川口憲治、石渡信一</p> <p>キネシン・微小管結合力の 1 分子顕微解析</p> <p>日本生物物理学会・第 36 回年会 九州大学 1998 年 10 月</p> <p>川口憲治、石渡信一</p> <p>温度パルス顕微鏡によるキネシン分子モーター機能の熱変調</p> <p>日本生物物理学会・第 36 回年会 九州大学 1998 年 10 月</p> <p>川口憲治、加藤宏一、石渡信一</p> <p>温度パルス顕微鏡によるキネシン分子モーターの熱変調画像化</p> <p>日本物理学会・第 53 回年会 東邦大学 1998 年 4 月</p> <p>川口憲治、加藤宏一、石渡信一</p> <p>温度パルス顕微鏡によるキネシン分子モーターの熱変調画像化</p> <p>生体運動合同班会議 東京 1998 年 1 月</p> <p>川口憲治、加藤宏一、石渡信一</p>
--	--



## 【謝辞】

本研究をご指導くださいました石渡信一教授に感謝いたします。有益な御指摘、御助言をくださった早稲田大学の浅井博教授、中村正久教授と船津高志教授に感謝いたします。最後に、本研究を進めるに際して有益な御助言をしてくださった石渡研究室の皆様にな心からの感謝の意を表します。